

NUCLEOTIDE PROBES AND METHOD FOR DETERMINING HLA DQB1 TYPING

Publication number: JP2000511430 (T)

Publication date: 2000-09-05

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- **international:** **C12N15/09; C12Q1/68; C12N15/09; C12Q1/68; (IPC1-7): C12N15/09; C12Q1/68**


- **European:** C12Q1/68M4


Application number: JP19980500276T 19970603


Priority number(s): WO1997FR00980 19970603; FR19960006822 19960603

Also published as:

 WO9746700 (A1)

 FR2749308 (A1)

 EP0910667 (A1)

 CA2257182 (A1)

Abstract not available for JP 2000511430 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9746700 (A1)**

Nucleotide probe selected in particular among the following: TG CGT TAT GTG ACC AGA, GTG CGT CTT GTG ACC AGA, GT CTT GTA ACC AGA CAC AT, CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT, CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT, CG ACC GAG CTC GTG CGG CGT G, G TAC CGG GCA GTG ACG C, G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G, G ACG CCG CTG GGG CCG CCT G, G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T, G GAG GGG ACC CGG GCG GAG T, TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C, GG ACG GAG CGC GTG CG, C ATC TAT AAC CGA GA, and their complementary sequences, being understood that the said probes have at least the underlined sequence, and can further contain one or two bases selected, respecting the sequence continuity, among the non-underlined bases. These probes are useful for determining a person's HLA DQ beta genotype. They have in particular the advantage of being useable at a single hybridization temperature, in particular 37 DEG C.

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

5 application(s) for: JP2000511430 (T)

- Data supplied from the *esp@cenet* database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-511430

(P2000-511430A)

(43) 公表日 平成12年9月5日(2000.9.5)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テコード* (参考)

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 41 頁)

(21) 出願番号 特願平10-500276

(86) (22) 出願日 平成9年6月3日(1997.6.3)

(85) 翻訳文提出日 平成10年12月3日(1998.12.3)

(86) 国際出願番号 P C T / F R 9 7 / 0 0 9 8 0

(87) 国際公開番号 W O 9 7 / 4 6 7 0 0

(87) 国際公開日 平成9年12月11日(1997.12.11)

(31) 優先権主張番号 9 6 / 0 6 8 2 2

(32) 優先日 平成8年6月3日(1996.6.3)

(33) 優先権主張国 フランス (FR)

(81) 指定国 E P (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), C A, J P, U S

(71) 出願人 ビオ メリウ

フランス国 69280 マルシールエトワ
ル (番地なし)

(72) 発明者 ムーガン, ブルーノ

フランス国 69008 リヨン, アベニュー
デ フレール リュミエール, 113

(74) 代理人 弁理士 松井 光夫

(54) 【発明の名称】 HLA DQB1 タイピングを決定するためのヌクレオチドプローブおよび方法

(57) 【要約】

特に下記配列 T G C G T T A T G T G A C C
 A G A, G T G C G T C T T G T G A C C
 A G A, G T C T T G T A A C C A G A C A
 C A T, C G T C T T G T A A C C A G A
 T A C A T, C G T C T T G T G A G C A
 G A A G C A T, C G A C C G A G C T C
 G T G C G G C G T G, G T A C C G G G
 C A G T G A C C C, G A C G C C G C T
 G G G I C C G C C T G, G A C G C C G
 C T G G G G C C G C C T G, G G A G
 G G I A C C C I G G C I G A G T, G G
 A G G G A C C C G G C G G A G T,
 T C G G T G G A C A C C G T A T G C A
 G A C, G G A C G G A G C G C G T G C
 G, C A T C T A T A A C C G A G A, およ
 びそれらの相補的配列から選択されるヌクレオチドプロ
 ーブであり、該プローブは、少なくとも下線部の配列を
 有し、さらに、配列の連続性は妨げないで下線部以外の
 塩基から選択される1または2個の塩基を含むことがで

きる。これらのプローブは、人のHLA DQB1遺伝子型の
 決定に有用である。それらは特に、単一のハイブリッ
 形成温度、特に37℃で安定であるという利点を有す
 る。

【特許請求の範囲】

1. 下記：

- TG CGT TAT GTG ACC AGA ,
- GTG CGT CTT GTG ACC AGA ,
- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT,
- CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT,
- GG ACC GAG CTC GTG CCG GGT G,
- G TAC CCG GCA GTG ACG C,
- G ACG CCG CTG GGT CCG CCT G,
- G ACG CCG CTG GGG CCG CCT G,
- G GAG GGT ACC CIG GCI GAG T,
- G GAG GGG ACC CCG GCG GAG T,
- TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C,
- GG ACG GAG CCG GTG CG,
- C ATC TAT AAC CGA GA ,
- GG ACC GAG ITT GTG CCG GGT G,
- C AAC GGG ACC GAG IGI GTG CG,
- GTG CGT CTT ITG ACC AGA TA,
- CGT CTT GTA ACC AGL TAC AT,
- T AAC CGA GAA GAG TAC GTG C,
- C GAG GAI GAC GTG CGC TT,
- GC GAC GTG IAI GTG TAC CG,
- G GGG IGI CCT IAC GIC GAG TAC T,
- GGG CCG CCT IAC ICC GAG,
- GGG CCI CCT GCC GGC GA,
- TG GAG GGG GCC CCG GCG TCG G,

およびそれらの相補的配列から選択されるヌクレオチドプローブであって、該プローブが少なくとも下線部の配列を有し、さらに、その配列の連続性を保持しながら下線部以外の塩基から選択される1または2個の塩基を含んでもよいヌクレオチドプローブ。

2. 下記配列：

- TG CGT TAT GTG ACC AGA ,
- GTG CGT CTT GTG ACC AGA ,
- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT,
- CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT,
- GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G,
- G TAC CGG GCA GTG ACG C,
- G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G,
- G ACG CCG CTG GGG CCG CCT G,
- G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T,
- G GAG GGG ACC CCG GCG GAG T,
- TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C,
- GG ACC GAG TTT GTG CGG GGT G,
- C AAC GGG ACC GAG IGI GTG CG,
- GTG CGT CTT TTG ACC AGA TA,
- CGT CTT GTA ACC AGI TAC AT,
- T AAC CGA GAA GAG TAC GTG C,
- C GAG GAI GAC GTG CGC TT,
- GC GAC GTG IAI GTG TAC CG,
- G GGG IGI CCT IAC GIC GAG TAC T,
- GGG CCG CCT IAC ICC GAG,
- GGG CCI CCT GCC GCC GA,
- TG GAG GGG GCC CGG GCG TCG G.

およびそれらの相補的配列によって定義されるものから選択される、請求項1に記載のプロープ。

3. 下記：

- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT,
- G TAC CGG GCA GTG ACG C,
- G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T,
- TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C,

およびそれらの相補的配列から選択される、請求項1に記載のプロープ。

4. 下記:

- G GGG IGI CCT IAC GIC GAG TAC T,
- GGG CCG CCT IAC ICC GAG,
- GGG CCI CCT GCC GCC GA.

から選択される、請求項1に記載のプロープ。

5. 下記:

- GG ACC GAG ITI GTG CGG GGT G,
- C AAC GGG ACC GAG IGI GTG CG,
- GTG CGT CTT ITG ACC AGA TA,
- CGT CTT GTA ACC AGI TAC AT,
- T AAC CGA GAA GAG TAC GTG C,
- C GAG GAI GAC GTG CGC TT,
- GC GAC GTG IAI GTG TAC CG,
- TG GAG GGG GCC CGG GCG TCG G.

から選択される、請求項1に記載のプロープ。

6. 下記配列:

- GC GAC GTG GAG GTG TAC CG,
- A GAG GAG GAC GTG CGC TT,

およびそれらの相補的配列によって定義されるものから選択される、請求項1に記載のプロープ。

7. 配列が下線部の配列およびそれらの相補的配列に対応する、請求項1～6のいずれか一つに記載のプロープ。

8. 該プロープが標識されているか、固体担体へのそれらの結合を容易にするためのリガンドにカップリングしているか、固体担体に結合していることを特徴とする、請求項1～7のいずれか一つに記載のプロープ。

9. サンプル中存在する標的核酸のHLA DQB1 タイピングを少なくとも部分的に決定する方法において、サンプル中の該核酸のオリゴヌクレオチドプロープとの公知方法によるハイブリッド形成の試験を行い、ハイブリッド形成が $37 \pm 2^\circ\text{C}$ に

等しい単一の温度で効果的に観察される試験を陽性の試験として選択し、該オリゴヌクレオチドプローブは請求項2で定義したものまたはそれらの相補的配列から選択される少なくとも一つのプローブを含み、該プローブは少なくとも下線部の配列を含み、さらに、配列の連続性は保持しながら下線部以外の塩基から選択される1または2個の塩基を含んでもよい方法。

10. 下記配列:

- ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG,
- GG CCT GTT GCC GAG TAC T,
- CGG CCT AGC GCC GAG TAC T,
- CGG CCT GAT GCC GAG TAC,

によって定義されるものまたはそれらの相補的配列から選択される少なくとも一つのプローブとサンプル中の核酸とのハイブリッド形成の試験をさらに行う、請求項9に記載の方法。

11. 下記配列:

- GC GAC GTG GAG GTG TAC CG,
- A GAG GAG GAC GTG CGC TT,

によって定義されるものまたはそれらの相補的配列から選択される少なくとも一つのプローブとサンプル中の標的核とのハイブリッド形成の試験をさらに行う、請求項9および10のいずれかに記載の方法。

12. 請求項3～5のいずれか一つで定義した少なくとも一つのプローブを使用する、請求項9～11のいずれか一つに記載の方法。

13. 該プローブを捕獲プローブとして使用する、請求項

9～12のいずれか一つに記載の方法。

14. 捕獲プローブとのハイブリッド形成により固体担体に結合された核酸の可

能性のある存在が、該捕獲プローブによって認識される以外の標的の領域とハイブリッド形成可能な標識された検出プローブによって示される、請求項13に記載の方法。

15. 検出プローブが、下記配列：

- GG ACG GAG CGC GTG CG,
- C ATC TAT AAC CGA GA ;
- CGC TTC GAC AGC GAC GTG G.

によって定義されるものまたはそれらの相補的配列から選択される、請求項14に記載の方法。

16. 該プローブが請求項7と同様に定義されることを特徴とする、請求項9～15のいずれか一つに記載の方法。

17. 請求項1～6のいずれか一つで定義されるものから選択される少なくとも一つのプローブを含み、さらに、下記配列：

- ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG,
- GG CCT GTT GCC GAG TAC T,
- CGG CCT AGC GCC GAG TAC T,
- CGG CCT GAT GCC GAG TAC,
- A GAG GAG GAC GTG CGC TT,
- GC GAC GTG GAG GTG TAC CG,
- CGC TTC GAC AGC GAC GTG G,

によって定義されるものまたはそれらの相補的配列から選択される1以上のプローブを含み得る、HLA DQB1タイピング用キット。

18. 下記配列：

- TG CGT TAT GTG ACC AGA ,
- GTG CGT CTT GTG ACC AGA ,
- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT ,
- CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT ,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT ,
- GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G ,
- G TAC CGG GCA GTG ACG C ,
- G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G ,
- G ACG CCG CTG GGG CCG CCT G ,

- G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T ,
- G GAG GGG ACC CGG GCG GAG T ,
- TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C ,

によって定義されるプローブまたはそれらの相補的配列を含み、さらに、下記配列：

- ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG ,
- GG CCT GTT GCC GAG TAC T ,
- CGG CCT AGC GCC GAG TAC T ,
- CGG CCT GAT GCC GAG TAC ,
- A GAG GAG GAC GTG CGC TT ,
- GC GAC GTG GAG GTG TAC CG ,

によって定義されるものまたはそれらの相補的配列から選択される1以上のプローブを含み得る、請求項17に記載のキット。

19. 下記配列：

- TG CGT TAT GTG ACC AGA,
- GTG CGT CTT GTG ACC AGA ,
- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT,
- CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT,
- GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G,
- G TAC CGG GCA GTG ACG C,
- G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G,
- G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T,
- TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C,
- ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG,
- CGG CCT AGC GCC GAG TAC T,
- CGG CCT GAT GCC GAG TAC,
- GC GAC GTG GAG GTG TAC CG,

またはそれらの相補的配列によって定義されるプローブおよび所望により下記：

- A GAG GAG GAC GTG CGC TT,
- GG CCT GTT GCC GAG TAC T,

またはそれらの相補的配列を含む、請求項17に記載のキット。

20. 請求項3～5のいずれか一つに記載の少なくとも一つのプローブを含む、請求項17に記載のキット。

21. 請求項3および／または請求項4および／または請求項5で定義したプローブを含む、請求項20に記載のキット。

22. 該プローブが捕獲プローブとして使用できる、請求項17～21のいずれか一つに記載のキット。

23. さらに、下記：

- GG ACG GAG CGC GTG CG,
- C ATC TAT AAC CGA GA ,
- CGC TTC GAC AGC GAC GTG G.

から選択される少なくとも一つの標識された検出プローブを含む、請求項18～

22のいずれか一つに記載のキット。

24. 該プローブが請求項7と同様に定義される、請求項17～23のいずれか一つに記載のキット。

【発明の詳細な説明】

HLA DQB1タイピングを決定するための

ヌクレオチドプローブおよび方法

本発明の主題は、個々のHLA DQベータ (DQB) 遺伝子型を決定するための方法、プローブおよびキットである。

本発明の方法、プローブおよびキットは、特に、多型性HLA DQB1遺伝子の検出に関する。本発明のこの方法ならびにこれらのプローブおよびキットは、特に、移植におけるHLAタイピング、医療診断および法医学に適用できるが、HLA DQB1対立遺伝子の有無はインシュリン依存性糖尿病などの或る種の病気に対する感受性の指標としても役に立つと考えられる。

HLA (ヒトリンパ球抗原) 系は、ヒトの主要組織適合性複合体によってコードされる。それは、自己と非自己とを区別することにより、個人間の臓器移植の際の主な束縛となる。従って、HLA系の抗原は、臓器移植の際のドナーとレシピエントとの間の特徴および或る種の病気に対する個人の素質を決定するためのタイピング方法において使用されている。

遺伝的観点から、HLA系は十分解析され、第6染色体の短腕上に約2センチモルガンの間隔で位置する、多かれ少なかれ多型性の一連の遺伝子座から成る。この系の3個の遺伝子座 (HLA-A、BおよびC) は、共優生的に発現され

る一群のアロ抗原 (クラスI) をコードする。別の領域 (HLA-D) は実際にいくつかの遺伝子を含み、高度の多型性で共優生的に発現される第二群のアロ抗原 (クラスII) をコードする。他の特に成分C2、C4を制御するいくつかの遺伝子座および相補カスケード因子BfもHLA系に属する (クラスIII)。臓器移植の成功は、かなりの部分が、レシピエントとドナーとの間のHLA同一性 (クラスIおよびII) に依存する。従って、HLAタイピングはできる限り正確であるべきである。この要求は、主に、腎臓移植および骨髓移植に当てはまる。骨髓移植の場合は、クラスIIHLA抗原のレベルでの完全な同一性が移植成功のための、すなわち、移植片拒絶反応または移植片対宿主病の進行の回避のための決定的な因子を表す。

HLA-D領域に関する遺伝子の発現産物の多型性は、通常は、細胞表面で発現さ

れるHLA遺伝子の産物のアロ抗血清を使用した分析に基づく血清学的技法によって明確にされた。しかし、最良の条件下でさえも、存在する多数の対立遺伝子は、これらの血清学的技法によって検出できない。

HLA DQB1遺伝子座のレベルでの多型性は、DQ w1、2、3および4の特異性を定義する血清学的タイピング試薬を使用して検出された(WHO Nomenclature Committee, 1990)。DQ w1特異性は、次いで、血清学的サブタイプDQ w5および6にさらに分類され、DQ w3は、DQ w7、8および9にさらに分類された。しかし、決まって使用される血清型の分類法では、DQ w1、DQ w2、DQ w3の特異性が区別される

に過ぎない。

本発明では、分子生物学を使用することにより、以前考えられていたよりも多くのHLA遺伝子が存在し、特に多くのより異なる対立遺伝子が存在することが分かった。そこで、この多様性を、異なる遺伝子および対立遺伝子のDNA配列のレベルで解析する。HLA-D領域で公知の構造、配列および多型性は、TROWSDALEら、1985, Immunol.Rev.85:5-43に掲げられている。

遺伝子型分析は、クラスII HLA系、特にHLA DQの多様性を遺伝子のレベルで直接分析することを可能にする新規方法である。遺伝子型分析は、分子ハイブリッド形成の原理に基づいており、提案された最初の方法は、制限酵素の使用によるDNAの断片化および得られた断片のサイズの分析で構成されるいわゆる「RFLP」法である。例えば、米国特許第4,582,788号を参照。

RFLP法は、7個のDQ特異性の同定に使用できる。しかし、RFLP分析は、血清学では検出できない或る種の対立遺伝子の相違のみの確認を可能にするものであり、この方法によって提供される可能性は限られている。実際、対立遺伝子は、突然変異が使用される制限酵素の認識部位に位置することを特徴とする場合にのみ同定でき、従って、多くの対立遺伝子はこの分析では確認されない。さらに、RFLP分析は、コード配列における修飾をめったに同定せず、修飾の正確な性質に関する情報を提供するものではない。最後に、この方法は、使用に時間がかかり、困難である。

クラスII HLA遺伝子型を分析するための別の方法が提案されており、いわゆる「オリゴヌクレオチドをベースとするタイピング」法である。これは、クラスII HLA遺伝子、特にDQB遺伝子のDNA配列の知識により、その遺伝子の配列の所与の部位で特異的にハイブリッド形成するオリゴヌクレオチドを多型性分析のためのトレーサーとして使用する。これらのオリゴヌクレオチドは、それらの配列の相違に基づいてそれらのハイブリッド形成またはハイブリッド形成の欠如により可能な最大量の情報が得られ、種々の対立遺伝子が同定されるように選択される。たとえそれらが単一のヌクレオチドに影響を及ぼすとしても、配列のいかなる相違も検出が可能であるべきである。

オリゴヌクレオチドをベースとするタイピング法は、ANGELINIら、*Nat. Acad. Sci. USA* vol.83: 4489-4493 (1986) の文献に記載されているようにDNAに適用することができ、またRNAにも適用可能である(C. UCLA, J.J. VAN ROOD, J. GORSKI, B. MACH(1987) *J. Clin. Invest.* 80, 1155を参照)。

PCRなどの核酸増幅法は、個々人のクラスII HLAのDNAの分析を容易にした。クラスII HLAのためのオリゴヌクレオチドをベースとするタイピングの最初の適用は、上記で引用した文献にANGELINIらが示しており、標的DNAをナイロン膜に付着させ、標識されたオリゴヌクレオチドプローブによって検出を行ういわゆる「サザン」法を使用している。そのとき、その方法は、通常の血清学では

同定できないクラスII HLA対立遺伝子の検出に適用された(J.M. TIERCY, J. GORSKI, M. JEANNETおよびB. MACH(1988)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 198ならびにJ. M. TIERCY, J. GORSKI, H. BETUEL, A.C. FREIDEL, L. GEBURER, M. JEANNETおよびB. MACH(1989)*Human Immunol.* 24, 1を参照)。クラスII HLAタイピングへの別の直接の適用は、いわゆる「ドットプロット」法を使用した国際特許出願PCT WO 89/11547に記載されたものである。いわゆる「逆ドット」法は、紙またはニトロセルロース膜にヌクレオチドプローブを結合し、標識された標的のハイブリッド形成の検出を行うことから成るが、これは、HLADQAタイピングおよび地中海性β-サラセミア突然変異の検出に適用されている(R.K. SAIKIら、*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* vol. 86, p. 6230-6234; (1989))。

細胞のタイピングは、ゲノムの点変異の検出を必要とし、一つのヌクレオチド内の相同配列の検出および相同配列間の区別に十分感受性のあるプローブの開発を伴う。そのために、一般には30ヌクレオチド未満であり、テストに関して高い特異性を与えるが、良好な感受性は保持したままである短いプローブを使用する。短いオリゴヌクレオチドの使用は、広い選択性を持つことを可能にする。

さらに、高い特異性および良好な感受性を示すだけでなく、さらには使用が簡単であり、迅速に行うことができ、安価であり、容易に自動化することができるタイピング方法の開発が望まれている。

本発明は、これらの要件を満たすHLA DQB1タイピングのための方法ならびにプローブおよびキットに関する。

本発明の方法は、cDNA鋳型などの各種起源の異型接合性サンプルをタイピングするのに使用することができ、また、通常の血清学的方法では区別できない対立遺伝子変異体の検出に使用することができる。

本発明のプローブは以下に説明するが、サザン型の方法において検出プローブの形（通例のトレーサーで標識）で使用することができ、あるいは、好ましくは、固体担体上に固定化した捕獲プローブの形（サンドイッチまたは逆ドットプロット法）で使用できる。

本発明のタイピング系は、好ましくは、DUNN A.R., HASSEL J.A. (Cell, 12, 23, 1977) で最初に記載されたいわゆる「サンドイッチ」プロトコルを使用する。それは、固体担体に結合し、サンプル中の標的遺伝子に特異的である捕獲プローブという第一のヌクレオチドプローブおよびその標的の別の領域に相補的であり、マーカーによって示すことによりハイブリッド形成の検出を可能にする、第二の標識されたプローブ、いわゆる検出プローブを使用することから成る。本発明の系では、マーカーは例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼなどの酵素であり、他の適する任意のマーカーも使用できる。

本発明の方法は、その長さおよび組成物が、必要とされる特異性および感受性を付与するだけでなく、規定された温度での使用を可能にするように選択されたオリゴヌク

レオチドプローブの選択に基づく。すなわち、本発明のタイピング系は、特に、 $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ の単一温度での操作を可能にするという利点を有する。

しかし、明らかなように、所与の温度で点変異を検出することを意図したプローブの場合ですら、特にハイブリッド形成複合体の安定性を多かれ少なかれ促進する緩衝溶液を使用することによりその長さが或る程度変えられるプローブの使用を意図することが可能である。本発明のプローブは、従って、特に、操作を 37°C 付近であるが、 37°C ではない（実際には、温度検定において誤差を生じることが多い）温度で行うことが望ましい場合、その長さが一般に最大であると考えられる配列によって規定され、さらに、 37°C の温度に最適な配列も示される。

専門家であれば、各特定のオリゴヌクレオチドプローブに対応する相補プローブもちろん、捕獲または検出プローブと同じ役割を果たし得ることは明らかである。本発明は従って、下記に説明するプローブと相補的な配列を有するプローブおよびこれらの相補的配列を使用する方法にまで拡張される。

本発明の主題は、上記した要件を満たすように選択されたヌクレオチド配列を有するプローブである。特に、本発明は、その併用により種々の対立遺伝子間を区別し、必要であれば、今日までに知られている種々のHLA DQ特異性（HLA因子の命名、1995, Bodmer Julia Gら、TissueAntigens, 1995, 46, 1-18）を同定することすら可能に

する新規プローブに関する。

本発明のヌクレオチドプローブは、特に下記に示すものから選択される（配列は、左から右へ5' 端→3' 端を示す。）。アルファベット文字は通常の命名によるヌクレオチド（または塩基）を表す。下線部の配列は、本発明に係る好ましい操作条件下での最適配列を表す。従って、プローブは、少なくとも下線部の配列を含み、さらに、下線部以外の塩基から選択される1または2個の別の塩基を含むことができる。すなわち、場合に応じて（もちろん、その配列の連続性は保存して）、5' 端に1または2個の別の塩基、あるいは、3' 端に1または2個の別の塩基、あるいは、5' 端に1個の別の塩基および3' 端に1個の別の塩基を含むことができる。ハイブリッド形成および洗浄温度ならびにハイブリッド形

成および／または洗浄緩衝剤の性質などのハイブリッド形成結合強度を変えることを可能にする操作条件に応じて使用されるプローブの長さが調節可能であることは実際、公知である。修飾塩基（例えば、イノシン）のプローブへの導入は、同様の役割を果たすと考えられる。本発明のプローブは、特に、下記配列（各プローブに対して、認識される特異性が示されている）またはそれらの相補配列から選択される。

TG CGT TAT GTG ACC AGA

(26B) : これは、DQB1 06011、06012、0301および0304特異性を認識する；

GTG CGT CTT GTG ACC AGA

(26C) : DQB1 0602、0302および03032特異性；

GT CTT GTA ACC AGA CAC AT

(26D) : DQB1 0603、0604、0607および0608特異性；

CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT

(26F) : DRQB1 06051、06052、0606および0609特異性；

CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT

(26E) : 0201および0202特異性；

GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G

(23A) : DQB1 0401特異性；

G TAC CGG GCA GTG ACG C

(49A) : DQB1 0501特異性；

G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G

(55A) : DRB1 0301、0302、03032、0304および0305特異性；

G ACG CCG CTG GGG CCG CCT G

(55' A) : DRB1 0301、0302、03032、0304および0305特異性；

G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T

(70A) : DRB1 0602、0603および0608特異性；

G GAG GGG ACC CGG GCG GAG T

(70' A) : DRB1 0602、0603および0608特異性；

TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C

(70B) : DRB1 0401および0402特異性。

本発明のプローブはまた、下記にそれらのヌクレオチド配列を定義するプローブ23a、23B、26c、26f、37C、37a、45a、57D、57E、57Fおよび70Cでもあり、それらが認識する特異性は、添付の表4に示す。

もちろん、所望ならば、添付する表1および2に示されるように、追加のプローブとして使用される他のプローブによって或る一定の特異性間の区別を行うことができる。

本発明の新規プローブはまた、下記に説明するプローブHRP1およびHRP2を含む。

上記したオリゴヌクレオチドプローブの配列において、Iはイノシンを表す。イノシンは、プローブの判別能を、このプローブがこのプローブを有するサンプル中の試験標的のものと厳密には同一でない核酸配列と形成するハイブリッドをさらに不安定にすることにより高めるために、本発明の或る種のプローブで使用される非天然のヌクレオチドである。

本発明の記載において、23A、26A、26Bなどの後ろに文字が付いた数字または後ろに数字が付いた文字（HRP1など）を含む任意の名称は、このように定義し

たプローブ全体（下線部の配列のみを含むもの、およびさらに1または2個の下線部以外の別の塩基を含むもの）を示すが、ただし、下記の実験部分および添付の表においては、これらの名称は下線部の最適配列を有するプローブのみを示す。

本発明の主題はまた、サンプル中に存在する核酸のDQB1タイピングを少なくとも部分的に決定する方法である。該

方法では、公知の方法に従って、サンプル中の該核酸のオリゴヌクレオチドプローブとのハイブリッド形成の試験を行い、 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ に等しい単一の温度でハイブリッド形成が効果的に観察される試験を陽性の試験として選択し、該オリゴヌクレオチドプローブは、下記：

TG CGT TAT GTG ACC AGA (26B),
GTG CGT CTT GTG ACC AGA (26C),
GT CTT GTA ACC AGA CAC AT (26D),
CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT (26F),
CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT (26E),
GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G (23A),
G TAC CGG GCA GTG ACG C (49A),
G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G (55A),
G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T (70A),
TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C (70B),
GG ACC GAG ITI GTG CGG GGT G (23a),
C AAC GGG ACC GAG IGI GTG CG (23B),
GTG CGT CTT ITG ACC AGA TA (26c),
CGT CTT GTA ACC AGI TAC AT (26f),
T AAC CGA GAA GAG TAC GTG C (37C),
C GAG GAI GAC GTG CGC TT (37a),
GC GAC GTG IAI GTG TAC CG (45a),
G GGG IGI CCT IAC GIC GAG TAC T (57D),
GGG CCG CCT IAC ICC GAG (57E),
GGG CCI CCT GCC GCC GA (57F),
TG GAG GGG GCC CGG GCG TCG G (70C),

またはそれらの相補的配列から成る群から選択される少な

くとも1つのブロープを含み、理解されるように、該ブロープは、少なくとも下線部の配列を含み、さらに、配列の連続性は保持しながら下線部以外の塩基から選択される1または2個の塩基を含んでもよい。

本発明は特に上記した方法に関し、該方法では、
 -プローブ26D、26E、49A、70Aおよび70Bの少なくとも一つ、
 -プローブ26E、49A、70Aおよび70Bの少なくとも一つ、
 -および／またはプローブ57D、57Eおよび57Fの少なくとも一つ、
 -および／またはプローブ23a、23B、26c、37C、37a、45aおよび70Cの少なくとも一つ
 が使用される。
 本発明はまた、上記した方法において、さらに、サンプル中の核酸と下記プローブ：

ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG

(26A)；認識されるDQB1特異性：0501、0502、05031、05032、0602、0604、0607および0608；

GG CCT GTT GCC GAG TAC T

(57A)；認識されるDQB1特異性：0501、0604、06051、0606、0608および0609；

CGG CCT AGC GCC GAG TAC T

(57B)；認識されるDQB1特異性：0502および0504；

CGG CCT GAT GCC GAG TAC

(57C)；認識されるDQB1特異性：05032、0602、0603および0607；

GC GAC GTG GAG GTG TAC CG

(45A)；認識されるDQB1特異性：0301および0304；

A GAG GAG GAC GTG CGC TT

(37A)；認識されるDQB1特異性：06011および06012；またはそれらの相補的配列

の少なくとも一つとのハイブリッド形成の試験を行う方法にも関する。

本発明は特に、上記した方法において、3個のプロープ57D、57Eおよび57Fをプロープ57A、57Bおよび57Cの少なくとも一つと組み合わせて使用する方法に関する。

もちろん、陽性であるとして選択される試験はなおも上記した通りである。

本発明の方法において、使用されるハイブリッド形成条件は、明らかにように、標的がプロープのものと完全に相補的である配列を含む場合のみ、各プロープとのハイブリッド形成が選択した単一温度で生じるように予め決められた条件である。これらの条件は、通常の簡単な実験によって決定することができる。標的はもちろん、サンプル中に存在し、個人のHLA-DQ遺伝子の多型性領域を含む核酸である。

専門家であれば、本発明方法で使用できる各種プロープが、選択した技術に応じて、標識されたプロープまたは

固体担体への結合を容易にすることを意図したリガンドに結合したプロープ、あるいは、固体担体にすでに結合したプロープのいずれであってもよいことは容易に理解される。特に、プロープは、公知方法に従って、固体担体上に固定してあってもよく、または、固定可能であってもよく、その場合は、捕獲プロープとして使用できる。

特定の態様によれば、ハイブリッド形成試験を、捕獲プロープとして上記したプロープ、すなわち固体担体に結合したプロープを使用して行う。

所与の捕獲プロープとのハイブリッド形成によって固体担体に結合した核酸の可能な存在を示すために、該捕獲プロープによって認識される以外の標的の領域とハイブリッド形成できる標識された検出プロープを使用することができる。特に、下記（下線部は、上述したように、最小配列に相当する。）：

GG ACG GAG CGC GTG CG (HRP1),

C ATC TAT AAC CGA GA (HRP2),

CGC TTC GAC AGC GAC GTG G (HRP3).

から選択される検出プローブを使用することが可能である。

添付した表1を見ると、これらの検出プローブの中でどれが所与の捕獲プローブとともに使用可能であるかを容易に決定することができる。

本発明方法によれば、対立遺伝子の同定は、各々個々のプローブがHLA DQ遺伝子の異なる部分に特異的である一

連のプローブの結合モデルから推定できる。いくつかのプローブを選択することによって、本発明のオリゴヌクレオチドをベースとするタイピング法は、所望ならば、全てのDQB1対立遺伝子の同定を可能にする。たとえ新しい対立遺伝子が発見されても、これらはクラスII HLA配列の記録に掲載され、これは別のプローブによる特定のプローブの集合の更新を可能とし、従って、その方法を任意の新規対立遺伝子の検出に適応することが可能となる。

完全なクラスII HLAタイピングを合理化するために、まず第一に可能なことは、一定の数のプローブの使用により主なHLA DQB特異性の同定を可能にする第一のDQBタイピング工程を行うことである。

この工程は、多数の臨床用途にとって十分であることが多い。しかし、本発明は、多数のプローブにより、今日までに公知の全てのHLA DQB特異性の認識を可能にするDQBタイピングの第二の工程も許容する。

本発明のオリゴヌクレオチドをベースとするタイピング法によるHLA DQB特異性の分析は、血清学に代わるものとして、通常のDQBタイピングのための組織適合性研究室で使用でき、特に、腎臓移植を待っている名簿にある患者のDQBタイピングまたは可能性のある腎臓ドナーのタイピング、骨髄移植を予定している白血病患者のDQBタイピングおよびその家族または血縁関係のない可能性のあるドナーのタイピング、ボランティアとしての骨髄ドナー名簿作成のための大規模なDQBタイピングを行い、あるいは、

予防医学への適用または実父調査および他の法的確認のための、例えばインシュリン依存性糖尿病の場合の病気とHLA系との関連性を決定することができる。

HLA DQB核酸を含むどの型の組織も本発明方法におけるサンプルとして使用で

きる。また、サンプルに存在する核酸の化学的または酵素的切断などの後に得られた核酸の断片（DNAまたはRNA）を使用することもできる。しかし、実際には、DNAまたはRNAの増幅予備工程を行うべきである。

個々のHLA DQB1タイピング用キットも本発明の主題である。該キットは、次のプローブ：26B、26C、26D、26F、26E、23A、49A、55A、70A、70B、23a、23B、26c、26f、37C、37a、45a、57D、57E、57F、70C、HRP1およびHRP2の少なくとも一つを含み、さらに、26A、57B、57C、37A、45A、57AおよびHRP3から選択される1以上のプローブを含むことができる。

本発明方法および対応するキットにおいて、示したプローブは、もちろん、それらの相補的配列で置き換えることができる。

本発明は特に、次のプローブ（特に捕獲プローブ）：26B、26C、26D、26E、26F、23A、49A、55A、70A、70B、26A、57B、57C、57Aならびに所望によりプローブ45Aおよび37Aの少なくとも一つを含むキットに関する。このキットは、さらに、HRP1、HRP2およびHRP3から選択される1以上の検出プローブを含むことができる。

本発明はまた、下記：

—プローブ26D、26E、49A、70Aおよび70Bの少なくとも一つ、
—またはプローブ26E、49A、70Aおよび70Bの少なくとも一つ、
—および／またはプローブ57D、57Eおよび57Fの少なくとも一つ、
—および／またはプローブ23a、23B、26c、26f、37C、37a、45aおよび70Cの少なくとも一つ
を含むキットに関する。

本発明は、特に、下記プローブ：

23a、23B、26c、26D、26E、26f、37a、37C、45a、49A、57A、57B、57C、57D、57E、57F、70A、70Bおよび70Cを含むキットに関する。

これらのプローブの使用により集められた情報は、次いで、使用したプローブならびにリストに記載されたHLADQBタイプおよび／または関連のサブタイプの知見を考慮して、確立されたタイピング計画によるタイピングの決定に使用される

。この作業は、タイピング計画、すなわち、タイプおよび／またはサブタイプを認められる陽性反応（ハイブリッド形成）の関数として直接示す表の使用により簡略化される。タイピング計画の例は、添付の表3および5に示す。

本発明で使用するプローブは、適切な条件下でそれらの相補的配列に特異的に結合し得る配列に特異的なオリゴ

ヌクレオチド（OSS）である。ある特定のプローブが唯一のプローブの同定に使用できる場合、そのプローブはOSAと言う。すなわち、一つの対立遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドである。すでに上記したように、一つのプローブでは、特異的なDQB対立遺伝子をそれ自身で同定することができない。

本発明で使用するいくつかの用語の定義を以下に示す。

「遺伝子型」とは、遺伝子の発現産物、特にタンパク質の分析によって示される個々の特徴である「表現型」とは反対の、個々のゲノムの特徴を意味する。

「対立遺伝子」は、同じ遺伝子の別の種々の型を示し、核酸配列のレベルで相違を示す。これらの相違は、DNAのレベル、RNAのレベルおよびそれらのタンパク質への翻訳のレベルで示される。

「多型性」は、同じ遺伝子の異なる対立遺伝子の存在によって一つの集団にもたらされる多様性を特徴とする。

本明細書で使用する「オリゴヌクレオチド」は、プライマー、プローブまたは検出しなければならない核酸断片などを示す。オリゴヌクレオチドは、適切な任意の公知方法によって調製できる。

本発明の説明および以下の実験部分では、添付する表1～4を参照する。なお、同じプローブ名（26A、HRP3など）は、下線部の最小配列を示すことによりいくつかのプローブが規定できる配列（上記の説明の場合）のみだけでなく、下線部の最小配列に対応する配列（下記実施例およ

び添付する表1～4の場合）も示し得ることに注意すべきである。

添付の表1には、DQBI 0501である選択したコンセンサス配列に関して、表2に表したアミノ酸突然変異（一文字コードによって指定）に対応する突然変異の

位置を規定することによるDQB遺伝子の種々の対立遺伝子のDNAの配列が表してある。DNAの突然変異は、非サイレント突然変異、すなわち、その翻訳によりアミノ酸の変化をもたらす突然変異であってもよい。

種々の対立遺伝子のタイピングの場合は、大多数において明らかにそうである、非サイレント突然変異に相当するDNA上の突然変異を使用することが非常に多いが、例えば2個の非常に類似した対立遺伝子間を区別することにより、サイレント型の突然変異を検出することが可能である。

今日までに公知の文献で知られ、発表された全ての対立遺伝子に関するDQB1遺伝子のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を表1および2に示す。

添付する表3は、プローブと認識される特異性との間の対応をまとめたものであり、ある列の四角が黒く塗られている場合、これは、この列で挙げた特異性が、対応の欄のプローブによって認識されることを意味する。

添付の表4は、プローブおよびHLA DQB1特異性の間の対応を再現したものであり、さらに、サイレント突然変異または変異アミノ酸を示す。

下記実施例により本発明を説明する。

実施例1：

固体担体への結合を促進するリガンドに結合した各種プローブを作製した。使用したリガンドは、Aminolink 2 (Applied Biosystems社製、参照番号400808) という市販の化合物である。

リガンドのオリゴヌクレオチドへのカップリングは、下記の一般のプロトコールに従って行われる。

オリゴヌクレオチドを、ホスホルアミダイト化学を使用してApplied Biosystems社製の自動381A装置上で製造者のプロトコールに従って合成する。オリゴヌクレオチドの合成が完了すると、無水アセトニトリルに0.2Mの濃度で溶解したホスホルアミダイトリガンドを合成機の位置Xに置き、標準的な自動合成プロトコールに従ってオリゴヌクレオチドの5'端によりリガンドの付加を行う。

33%水酸化アンモニウム溶液中、55℃で一晩脱保護を行い、次いで-20℃でエタノール沈殿を行った後、修飾オリゴヌクレオチド(リガンドに結合したものを)

真空中で乾燥し、1 mlの水に吸収させる。

5'端が修飾されたオリゴヌクレオチドをBrownlee RP18カラム (10mm-25cm) 上での逆相高性能液体クロマトグラフィーにより精製する。

条件：流速4.6 ml/分

勾配10%→35%の緩衝液A、30分；35%→100%の緩衝液B、3分

緩衝液A：0.1モルの酢酸トリエチルアンモニウム(TEAA)、pH7

緩衝液B：50%の緩衝液A + 50%のCH₃CN

実施例2：検出プローブの作製

実施例1と同様に使用し、活性化し、乾燥したオリゴヌクレオチドを200 μl の0.1Mホウ酸ナトリウム緩衝液(pH9.3)における 1.25×10^{-7} モル (5mg) のホースラディッシュペルオキシダーゼ(Boehringer Mannheim 413470)に吸収させる。

精製プロトコールは同じである。コンジュゲートを-20℃で40%のグリセロールを含むトリス-HCl緩衝液(pH7)に保存する。

実施例3：標的DNAの増幅

増幅は、下記のプライマーを使用してPCRにより行う。

ープライマー1：

5' C ATG TGC TAC TTC ACC AAC GG 3'

ープライマー2：

5' CTG GTA GTT GTG TCT GCA CAC 3'

これらのプライマーは、表1ではDQBAMP-AおよびDQBAMP-Bの名称で示す。

実施例4：

マイクロタイタープレート(Nunc 43454)のウェルに、3xPBS (0.45MのNaCl、0.15Mのリン酸ナトリウム、pH7) に

おける10~400nMの濃度の所与のDQ特異性の捕獲オリゴヌクレオチド溶液100 μlを入れる (1個の捕獲オリゴヌクレオチド/ウェルの割合)。従って、タイピン

グに必要な捕獲プローブと同じほどの多くのウェルを使用する。プレートは37℃で2時間、または室温で15~22時間インキュベートする。

全てのケースにおいて、増幅工程および検出工程をチェックするために陽性の対照を添加する。陽性の対照(C+とする)として使用する捕獲プローブは、今日までに公知の全ての対立遺伝子上に存在する。その配列は次の通りである。

5' GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAG GA 3'

捕獲プローブを陰性の対照(C-とする)として使用する。配列は次の通りである: 5' TAT GAA ACT TAT GGG GAT AC 3'。プレートを300 μ lのPBSトウイン (0.15MのNaCl、0.05Mのリン酸ナトリウム、pH7:0.5%トウイン20 (MERCK822184))で3回洗浄する。増幅産物を室温で5分間、10 μ lの2NのNaOHで変性する。この溶液に、10 μ lの2N酢酸、次いで2.3mlのハイブリッド形成緩衝液(PEG:0.1Mのリン酸ナトリウム、pH7、0.5MのNaCl、0.65%のトウイン20、0.14mg/mlのサケの精子DNA (Sigma D9156)、PEG 4000(Merck 807490 2%))および0.25mlの標識された検出プローブ(オリゴヌクレオチド-ペルオキシダーゼコンジュゲート)を順次添加する。最終溶液を0.1ml/ウェルの割合で各ウェルに分配する。プレートを37℃で60分

間インキュベートする。プレートを300 μ lのPBSトウインで3回洗浄する。オルトフェニレンジアミン(OPD)基質(Cambridge Medical Biotechnology参照番号456)のOPD緩衝液(0.05Mのクエン酸、0.1MのNa₂HPO₄、pH4.9)における4mg/ml濃度のもの100 μ lを各ウェルに添加し、使用直前に1/1000に希釈した30倍体積の過酸化水素を添加する。20分の反応の後、酵素活性を100 μ lの1N H₂SO₄でブロックし、492nmで読み取りを行う。

実施例5:

10個のDNAをPCR法に従って増幅する。次いでタイピングを行う。タイピングのプロトコルは、一般には、上記したものに従う。ハイブリッド形成は、サンドイッチ法に従って行う。

タイピングのプロトコルでは、上記した捕獲プローブおよびケースに応じて検出プローブHRP1、HRP2またはHRP3を使用する。

記載した方法は、試験した10個のDNAのタイピングを可能にする。いくつかのタイピング結果を説明として下記に示す。

ケースNo.1:

プローブ	OD x 1000(492nm)
26A	15
49A	12
57B	38
57c	12
37A	12
26B	100
26C	1309
26D	10
26F	18
70A	32
26E	*****
55A	316
70B	12
23A	13

は飽和を意味する。

結果：患者はDQB1*0201または0202/0302または0303である。

ケースNo.2:

プローブ	OD x 1000(492nm)
26A	887
49A	12
57B	459
57c	11
37A	57

26B	80
26C	10
26D	14
26F	10
70A	14
26E	11
55A	11
70B	688
23A	302

結果：患者はDQB1*0502/0401である。

実施例6：

実施例5に記載の方法と同様の手順を行うが、添付の表5に列挙した捕獲プローブを使用する。

結果を添付の表6にまとめる。

1

[illegible]

2

[illegible]

表 2
一 統 葉

	50	60	70	80	90
DOB110501	R	Y	W	S	Q
DOB110502	A	W	N	S	K
DOB110503	V	Y	W	N	S
DOB110504	V	Y	W	N	S
DOB110505	V	Y	W	N	S
DOB110506	V	Y	W	N	S
DOB110507	V	Y	W	N	S
DOB110508	V	Y	W	N	S
DOB110509	V	Y	W	N	S
DOB110510	V	Y	W	N	S
DOB110511	V	Y	W	N	S
DOB110512	V	Y	W	N	S
DOB110513	V	Y	W	N	S
DOB110514	V	Y	W	N	S
DOB110515	V	Y	W	N	S
DOB110516	V	Y	W	N	S
DOB110517	V	Y	W	N	S
DOB110518	V	Y	W	N	S
DOB110519	V	Y	W	N	S
DOB110520	V	Y	W	N	S
DOB110521	V	Y	W	N	S
DOB110522	V	Y	W	N	S
DOB110523	V	Y	W	N	S
DOB110524	V	Y	W	N	S
DOB110525	V	Y	W	N	S
DOB110526	V	Y	W	N	S
DOB110527	V	Y	W	N	S
DOB110528	V	Y	W	N	S
DOB110529	V	Y	W	N	S
DOB110530	V	Y	W	N	S
DOB110531	V	Y	W	N	S
DOB110532	V	Y	W	N	S
DOB110533	V	Y	W	N	S
DOB110534	V	Y	W	N	S
DOB110535	V	Y	W	N	S
DOB110536	V	Y	W	N	S
DOB110537	V	Y	W	N	S
DOB110538	V	Y	W	N	S
DOB110539	V	Y	W	N	S
DOB110540	V	Y	W	N	S
DOB110541	V	Y	W	N	S
DOB110542	V	Y	W	N	S
DOB110543	V	Y	W	N	S
DOB110544	V	Y	W	N	S
DOB110545	V	Y	W	N	S
DOB110546	V	Y	W	N	S
DOB110547	V	Y	W	N	S
DOB110548	V	Y	W	N	S
DOB110549	V	Y	W	N	S
DOB110550	V	Y	W	N	S
DOB110551	V	Y	W	N	S
DOB110552	V	Y	W	N	S
DOB110553	V	Y	W	N	S
DOB110554	V	Y	W	N	S
DOB110555	V	Y	W	N	S
DOB110556	V	Y	W	N	S
DOB110557	V	Y	W	N	S
DOB110558	V	Y	W	N	S
DOB110559	V	Y	W	N	S
DOB110560	V	Y	W	N	S
DOB110561	V	Y	W	N	S
DOB110562	V	Y	W	N	S
DOB110563	V	Y	W	N	S
DOB110564	V	Y	W	N	S
DOB110565	V	Y	W	N	S
DOB110566	V	Y	W	N	S
DOB110567	V	Y	W	N	S
DOB110568	V	Y	W	N	S
DOB110569	V	Y	W	N	S
DOB110570	V	Y	W	N	S
DOB110571	V	Y	W	N	S
DOB110572	V	Y	W	N	S
DOB110573	V	Y	W	N	S
DOB110574	V	Y	W	N	S
DOB110575	V	Y	W	N	S
DOB110576	V	Y	W	N	S
DOB110577	V	Y	W	N	S
DOB110578	V	Y	W	N	S
DOB110579	V	Y	W	N	S
DOB110580	V	Y	W	N	S
DOB110581	V	Y	W	N	S
DOB110582	V	Y	W	N	S
DOB110583	V	Y	W	N	S
DOB110584	V	Y	W	N	S
DOB110585	V	Y	W	N	S
DOB110586	V	Y	W	N	S
DOB110587	V	Y	W	N	S
DOB110588	V	Y	W	N	S
DOB110589	V	Y	W	N	S
DOB110590	V	Y	W	N	S
DOB110591	V	Y	W	N	S
DOB110592	V	Y	W	N	S
DOB110593	V	Y	W	N	S
DOB110594	V	Y	W	N	S
DOB110595	V	Y	W	N	S
DOB110596	V	Y	W	N	S
DOB110597	V	Y	W	N	S
DOB110598	V	Y	W	N	S
DOB110599	V	Y	W	N	S
DOB110600	V	Y	W	N	S

表 3

[illegible]

表 4

オリゴヌクレオチド配列	ヌクレオチド配列	5'→3'	特異性
23A	s121L23	ACC GAG CTC GTG CGG GG	DQB1*0401
23b	s121L23	ACC GAG TTT GTG CGG GG	DQB1*0401
23B	s121R23	AC GGG ACC GAG TGT GTG	DQB1*0303+0402
26A	H30	C AGA CAC ATC TAT AAC	DQB1*0501+0502+0503+05032+0603+0604+0607+0608
26B	s125Y26	CGT TAT GTG ACC AGA	DQB1*0601+06012+06012+0601+0304
26C	s125L26	G CGT CTT GTG ACC AGA	DQB1*0602+0302+03032
26d	s125L26	G CGT CTT TTT ACC AGA	DQB1*0602+0302+03032
26D	L26s127	CTT GTA ACC AGA CAC	DQB1*0603+0604+0607+0608
26E	L26s128S30	T CTT GTG ACC AGA AGC	DQB1*0201+0202
26F	s125L26s127Y30	T CTT GTA ACC AGA TAC	DQB1*06031+06032+0606+0609
26f	s125L26s127Y30	T CTT GTA ACC AGT TAC	DQB1*06031+06032+0606+0609
37A	D37	AG GAG GAC GTG CGC	DQB1*0601+06012
37a	D37	AG GAG GAC GTG CGC	DQB1*0601+06012
37C	s135	AC CGA GAA GAG TAC GT	DQB1*0504
43A	E45	GAC GTG GAG GTG TAC	DQB1*0301+0304
45a	E45	GAC GTG TAT GTG TAC	DQB1*0301+0304
49a	A49	AC CGG GCA GTG AC	DQB1*0301
53A	L53P45	CG CGG CTG GGT CGG CTG G	DQB1*0301+0302+03032+0304+0305
57A	V27	CCT GTT GCC GAG TA	DQB1*0301+0604+06051+0606+0608+0609
57B	S27	G CCT AGC GCC GAG TA	DQB1*0302+0304
57C	D57	G CCT GAT GCC GAG T	DQB1*0502+0607+0603+0607
57D	D57	GG TGT CCT TAC GTC GAG TA	DQB1*05031+06011+06012
57E	P55D57	G CCG CCT TAC TCC G	DQB1*0301+0332
57F	P55A57	G CCI CCT GCC GCC	DQB1*0302+0304+0305

表 4
- 継列 -

オリゴヌクレオチド	変異アミノ酸	ヌクレオチド配列 5'→3'	特異性
70A	T71E74	AG GGI ACC CIG GCI GA	DQB1*0602+0603+0608
70B	T77A78	G GTG GAC ACC GTA TGC AG	DQB1*0401+0402
70C	G70A71	GAG GGG GCC CGG GGG TC	DQB1*0501+0502+05031+05032
C*	-	GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAG GA	-
C-	-	TAT GAA ACT TAT GGG GAT AC	-
HRP1	-	ACG GAG CGC GTG	-
HRP2	-	ATC TAT AAC CGA GA	-
HRP3	-	CGC TTC GAC AGC GAC GTG G	-

C*: 陽性の対照 C-: 陰性の対照 注: サイレント突然変異

変異アミノ酸は、文字コードで示し、後ろにそれらの位置を示す。

表 5

[illegible]

表 6

ケースNo.	陽性オリゴブローブ	HLA-DQB タイピング
1	C+, 70C, 57D, 26D, 57A	HLA-DQB1*05031 / 0804
2	C+, 70C, 57B, 57C, 70A, 26c	HLA-DQB1*0502 / 0802
3	C+, 57C, 70A, 26D, 57E, 45a	HLA-DQB1*0803 / 0301
4	C+, 70C, 49A, 57A, 23B, 70B	HLA-DQB1*0501 / 0402
5	C+, 57E, 45a, 26c, 57F	HLA-DQB1*0301 / 0302
6	C+, 26c, 26E, 57E	HLA-DQB1*0201 / 03032
7	C+, 26D, 57A, 26f	HLA-DQB1*0604 / 0609
8	C+, 70C, 57B, 45a, 57F	HLA-DQB1*0502 / 0304
9	C+, 57D, 37a, 70B, 23a	HLA-DQB1*0601 / 0401
10	C+, 57C, 57B, 57C, 70A, 26c	HLA-DQB1*0504 / 0802

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Application No.
PCT/FR 97/00980

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation or document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 11389 A (HOFFMANN LA ROCHE) 9 July 1992 see the whole document	1-24
X	WO 92 10589 A (HOFFMANN LA ROCHE) 25 June 1992 see the whole document	1-24
X	EP 0 459 532 A (CETUS CORP) 4 December 1991 see the whole document	1-24
X	EP 0 472 399 A (MITSUBI PETROCHEMICAL IND ;KITASATO INST (JP)) 26 February 1992 see the whole document	1-24
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in box E.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (see specification) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"I" later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "M" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 November 1997		Date of mailing of the international search report 25/11/1997
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-(0)20) 566-2040, Tx. 31 661 apo nl, Fax. (+31-(0)20) 340-3370		Authorized officer Molina Galan, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.
PCT/FR 97/00980

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Referent to claim no.
X	WO 92 08117 A (APPLIED BIOSYSTEMS) 14 May 1992 see the whole document	1-24
X	US 4 965 189 A (ONERBACH DAVID) 23 October 1990 see the whole document	1-24
X	WO 89 04875 A (CETUS CORP) 1 June 1989 see the whole document	1-24
X	DATABASE GENESEQ derwent Ac. No. Q34467, May 1993 CARRINGTON: "Distinguishing multiple alleles and identifying new alleles - by single-strand conformation polymorphism technique using specific gel electrophoresis conditions" XP002046163 see sequence & US7751892; 01-12-1992 (US DEP. HEALTH & HUMAN SERVICE)	1-24
X	DATABASE GENESEQ derwent Ac. No. Q34463, May 1993 CARRINGTON: "Distinguishing multiple alleles and identifying new alleles - by single-strand conformation polymorphism technique using specific gel electrophoresis conditions" XP002046164 see sequence & US7751892; 01-12-1992 (US DEP. HEALTH & HUMAN SERVICE)	1-24

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/FR 97/00980

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9211389 A	09-07-92	AT 150796 T	15-04-97
		AU 656549 B	09-02-95
		AU 9136891 A	22-07-92
		CA 2075052 A	22-06-92
		DE 69125368 D	30-04-97
		DE 69125368 T	09-10-97
		EP 0515660 A	02-12-92
		ES 2101083 T	01-07-97
WO 9210589 A	25-06-92	AU 656161 B	27-01-95
		AU 9136191 A	08-07-92
		CA 2075037 A	07-06-92
		EP 0514534 A	25-11-92
		JP 6505625 T	30-06-94
		US 5567809 A	22-10-96
EP 0459532 A	04-12-91	EP 0459533 A	04-12-91
		AT 125307 T	15-08-95
		AU 594130 B	01-03-90
		AU 6996287 A	17-09-87
		CA 1284931 A	18-06-91
		DE 3751423 D	24-08-95
		DE 3777213 D	15-04-92
		EP 0237362 A	16-09-87
		HK 145894 A	30-12-94
		JP 7313197 A	05-12-95
		JP 62214355 A	21-09-87
		SG 132994 A	13-01-95
		US 5567809 A	22-10-96
		US 5541055 A	30-07-96
		US 5665548 A	09-09-97
		US 5604099 A	18-02-97
EP 0472399 A	26-02-92	US 5468613 A	21-11-95
		US 5310893 A	10-05-94
		CA 2049449 A	21-02-92
		JP 2560160 B	04-12-96
		JP 5276954 A	26-10-93
		JP 8205899 A	13-08-96
		US 5663047 A	02-09-97

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/FR 97/00980

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9208117 A	14-05-92	NL 9002259 A EP 0553247 A	18-05-92 04-08-93
US 4965189 A	23-10-90	US 5059519 A	22-10-91
WO 8904875 A	01-06-89	AT 106454 T CA 1339098 A DE 3889927 D DE 3889927 T EP 0439458 A US 5665548 A	15-06-94 29-07-97 07-07-94 03-11-94 07-08-91 09-09-97

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

- TG CGT TAT GTG ACC AGA ,
- GTG CGT CTT GTG ACC AGA ,
- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT,
- CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT,
- GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G,
- G TAC CGG GCA GTG ACG C,
- G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G,
- G ACG CCG CTG GGG CCG CCT G,
- G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T,
- G GAG GGG ACC CGG GCG GAG T,
- TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C,
- GG ACG GAG CGC GTG CG,
- C ATC TAT AAC CGA GA ,
- GG ACC GAG ITI GTG CGG GGT G,
- C AAC GGG ACC GAG IGI GTG CG,
- GTG CGT CTT ITG ACC AGA TA,
- CGT CTT GTA ACC AGI TAC AT,
- T AAC CGA GAA GAG TAC GTG C,
- C GAG GAI GAC GTG CGC TT,
- GC GAC GTG IAI GTG TAC CG,
- G GGG IGI CCT IAC GIC GAG TAC T,
- GGG CCG CCT IAC ICC GAG,
- GGG CCI CCT GCC GCC GA,
- TG GAG GGG GCC CGG GCG TCG G,

1. The following :

And a nucleotide probe which may contain 1 or two bases which are chosen from bases other than an underline part while it is a nucleotide probe chosen from those complementary sequences, this probe has the arrangement of an underline part at least and the continuity of the arrangement is held further.

- TG CGT TAT GTG ACC AGA ,
- GTG CGT CTT GTG ACC AGA ,
- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT,
- CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT,
- GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G,
- G TAC CGG GCA GTG ACG C,
- G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G,
- G ACG CCG CTG GGG CCG CCT G,
- G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T,
- G GAG GGG ACC CGG GCG GAG T,
- TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C,
- GG ACC GAG ITT GTG CGG GGT G,
- C AAC GGG ACC GAG IGI GTG CG,
- GTG CGT CTT ITG ACC AGA TA,
- CGT CTT GTA ACC AGT TAC AT,
- T AAC CGA GAA GAG TAC GTG C,
- C GAG GAT GAC GTG CGC TT,
- GC GAC GTG IAT GTG TAC CG,
- G GGG IGI CCT IAC GIC GAG TAC T,
- GGG CCG CCT IAC ICC GAG,
- GGG CCI CCT GCC GCC GA,

2. Following arrangement : - TG GAG GGG GCC CGG GCG TCG G.

And the probe according to claim 1 chosen from what is defined by those complementary sequences.

- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT,
- G TAC CGG GCA GTG ACG C,
- G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T,

3. The following : - TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C,

And the probe according to claim 1 chosen from those complementary sequences.

- G GGG IGI CCT IAC GIC GAG TAC T,
 - GGG CCG CCT IAC ICC GAG,
4. The following : - GGG CCI CCT GCC GCC GA.

The probe according to claim 1 ** chosen.

- GG ACC GAG ITI GTG CCG GGT G,
 - C AAC GGG ACC GAG IGI GTG CG,
 - GTG CGT CTT ITG ACC AGA TA,
 - CGT CTT GTA ACC AGI TAC AT,
 - T AAC CGA GAA GAG TAC GTG C,
 - C GAG GAI GAC GTG CGC TT,
 - GC GAC GTG IAI GTG TAC CG,
5. The following : - TG GAG GGG GCC CGG GCG TCG G.

The probe according to claim 1 ** chosen.

- GC GAC GTG GAG GTG TAC CG,
- A GAG GAG GAC GTG CGC TT,

6. Following arrangement :

And the probe according to claim 1 chosen from what is defined by those complementary sequences.

7. Probe of any one statement of claim 1-6 corresponding to arrangement and those complementary sequences of underline part in arrangement.

8. Probe of any one statement of claim 1-7 carrying out coupling to ligand for sign of this probe being carried out, or making those combination to solid support easy, or having combined with solid support.

9. HLA DQB1 of target nucleic acid which exists in sample In a method of determining typing selectively at least, Hybridization by a publicly known method with an oligonucleotide probe of this nucleic acid in a sample is examined, Hybridization chooses an examination effectively observed at a single temperature equal to 37**2 ** as a positive examination, This oligonucleotide probe contains at least one probe chosen from things which claim 2 defined, or those complementary sequences, A method which may contain 1 or two bases which are chosen from bases other than an underline part while this probe holds the continuity of arrangement further including arrangement of an underline part at least.

- ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG,
- GG CCT GTT GCC GAG TAC T,
- CGG CCT AGC GCC GAG TAC T,
- CGG CCT GAT GCC GAG TAC,

10. The following arrangement :

A method according to claim 9 of examining further hybridization of at least one probe chosen from things defined as alike, or those complementary sequences, and nucleic acid in a sample.

- GC GAC GTG GAG GTG TAC CG,
- A GAG GAG GAC GTG CGC TT,

11. The following arrangement :

A method given in either of claims 9 and 10 which examines further hybridization of at least one

probe chosen from things defined as alike, or those complementary sequences, and a target nucleus in a sample.

12. A method of any one statement of claim 9-11 which uses at least one probe which any one of the claims 3-5 defined.

13. A method of any one statement of claim 9-12 which uses this probe as a capture probe.

14. A method according to claim 13 shown by a detection probe in which a field of a target except a possible existence of nucleic acid combined with a solid support by hybridization with a capture probe being recognized by this capture probe and hybridization are possible, and by which the sign was carried out.

- GG ACG GAG CGC GTG CG,

- C ATC TAT AAC CGA GA ,

15. A detection probe is the following arrangement. : - CGC TTC GAC AGC GAC GTG G.

A method according to claim 14 chosen from things defined as alike, or those complementary sequences.

16. A method of any one statement of claim 9-15, wherein this probe is similarly defined as claim 7.

17. At least one probe chosen from what is defined by any one of the claims 1-6 is included, and

- ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG,

- GG CCT GTT GCC GAG TAC T,

- CGG CCT AGC GCC GAG TAC T,

- CGG CCT GAT GCC GAG TAC,

- A GAG GAG GAC GTG CGC TT,

- GC GAC GTG GAG GTG TAC CG,

it is the following arrangement further. : - CGC TTC GAC AGC GAC GTG G,

A kit for HLA DQB1 typing which may contain one or more probes chosen from things defined as alike, or those complementary sequences.

- TG CGT TAT GTG ACC AGA ,
- GTG CGT CTT GTG ACC AGA ,
- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT,
- CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT,
- GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G,
- G TAC CGG GCA GTG ACG C,
- G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G,
- G ACG CCG CTG GGG CCG CCT G,

18. The following arrangement :

- G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T,
- G GAG GGG ACC CGG GCG GAG T,
- TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C,

Probes defined as alike or those complementary sequences are included, and it is the following

- ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG,
- GG CCT GTT GCC GAG TAC T,
- CGG CCT AGC GCC GAG TAC T,
- CGG CCT GAT GCC GAG TAC,
- A GAG GAG GAC GTG CGC TT,

arrangement further. : - GC GAC GTG GAG GTG TAC CG,

The kit according to claim 17 which may contain one or more probes chosen from things defined as alike, or those complementary sequences.

- TG CGT TAT GTG ACC AGA,
- GTG CGT CTT GTG ACC AGA ,
- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT,
- CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT,
- GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G,
- G TAC CGG GCA GTG ACG C,
- G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G,
- G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T,
- TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C,
- ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG,
- CGG CCT AGC GCC GAG TAC T,
- CGG CCT GAT GCC GAG TAC,

19. The following arrangement : - GC GAC GTG GAG GTG TAC CG,

Or it is the following by a probe and a request which are defined by those complementary

- A GAG GAG GAC GTG CGC TT,

sequences. : - GG CCT GTT GCC GAG TAC T,

Or the kit according to claim 17 including those complementary sequences.

20. The kit according to claim 17 containing at least one probe of any one statement of claim 3-5.

21. The kit according to claim 20 containing a probe which claim 3, claim 4, and/or claim 5 defined.

22. A kit of any one statement of claim 17-21 which this probe can use as a capture probe.

- GG ACG GAG CGC GTG CG,

- C ATC TAT AAC CGA GA ,

23. It is the following further. : - CGC TTC GAC AGC GAC GTG G.

A kit of any one statement of claim 18-22 containing at least one detection probe which is ** chosen, and by which the sign was carried out.

24. A kit of any one statement of claim 17-23 in which this probe is similarly defined as claim 7.

[Translation done.]

NOTICES *

PO and INPIT are not responsible for any
 images caused by the use of this translation.

.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original
 recisely.

.**** shows the word which can not be translated.

.In the drawings, any words are not translated.

ETAILED DESCRIPTION

Detailed Description of the Invention]

n order to determine HLA DQB1 typing A nucleotide probe and method The theme of this invention i
 he method, probe, and kit for determining each HLA DQ beta (DQB) genotype.

specially the method, probe, and kit of this invention are related with detection of polymorphis
 LA DQB1 gene. Although especially this method, these probes, and kit of this invention are
 pplicable to HLA typing in transplantation, medical diagnosis, and legal medicine, It is thought
 hat the existence of HLA DQB1 allele is helpful also as an index of susceptibility to the illness
 f insulin dependent diabetes mellitus etc. of a certain kind.

he code of the HLA (human lymphocyte antigens) system is carried out with a human major
 istocompatibility complex. It serves as the main restraints in the case of the organ
 ransplantation between individuals by distinguishing self and not-self. Therefore, the antigen o
 he HLA system is used in the typing method for determining an individual's genius over the
 eature and the illness of a certain kind between the donor in the case of an organ
 ransplantation, and a recipient.

series of loci of polymorphism which an HLA system is analyzed enough and located at intervals
 f about 2 centimorgans on the short arm of the 6th chromosome from a hereditary viewpoint are
 omprised to some extent. a group revealed in [three loci (HLA-A, B, and C) of this system]
 ***** — alloantigen (class I) is encoded. Another field (HLA-D) actually encodes the alloantige
 class II) of the second group revealed in ***** by advanced polymorphism including some genes.
 ome of other loci and complementary cascade factors Bf which control especially the ingredient C
 nd C4 also belong to an HLA system (class III). Most portion depends for a success of an organ
 ransplantation on the HLA identity (the class I and *II) between a recipient and a donor.
 herefore, HLA typing should be exact as much as possible. This demand is mainly applied to a
 idney transplantation and a bone marrow transplantation. In the case of a bone marrow
 ransplantation, the decisive factor for the evasion for a transplantation success of the perfect
 dentity in the level of a class IHLA antigen (i.e., advance of graft rejection or graft versus
 ost disease) is expressed.

olymorphism of the gene expression product about a HLA-D field was clarified by the serological
 echnique based on the analysis which usually uses the ARO antiserum of the product of the HLA
 ene revealed by cell table **. However, the allele of a large number in which even the bottom of
 he best condition exists is undetectable by such serological techniques.

he polymorphism in the level of HLA DQB1 locus was detected using the serological typing reagent
 igh defines DQ w1, 2 and 3, and 4 singularity (WHO Nomenclature Committee, 1990). DQ w1
 ingularity ranked second, it was further classified into serological subtype DQ w5 and 6, and DQ
 3 was further classified into DQ w7, and 8 and 9. However, the singularity of DQ w1, DQ w2, and
 Q w3 is only distinguished in the classification of the serotype used by being decided.

n this invention, by using molecular biology showed many HLA genes existed and allele which is
 specially different from many those existed rather than having thought before. Then, this
 iversity is analyzed on the level of the DNA sequence of a different gene and allele. A structur
 ublicly known in a HLA-D field, arrangement, and polymorphism are hung up over TROWSDALE et al.,
 985, and Immunol.Rev. 85:5-43.

genotypic analysis is a class II HLA system, especially the Norikata Arata method which makes it possible to conduct the direct method of analysis of the diversity of HLA DQ on the level of a gene. Genotypic analysis is based on the principle of molecule hybridization. The first proposed method is the what is called "RFLP" method. [that comprises fragmentation of DNA by use of a restriction enzyme, and obtained analysis of the size of a fragment] or example, refer to U.S. Pat. No. 4,582,788.

The RFLP method is applicable to identification of seven DQ singularity. However, RFLP analysis enables the check of only a difference of allele of a certain kind undetectable in serology. Possibility of being provided by this method is restricted.

Allele can be identified only when characterized by being located in the recognition site of the restriction enzyme in which mutation is used, therefore many alleles are not actually checked by this analysis. RFLP analysis rarely identifies the ornamentation in a coding sequence, and does not provide the information about the exact character of ornamentation. Finally, this method requires time for use and is difficult.

The option for analyzing class II HLA genotype is proposed, and it is the what is called "type which makes oligonucleotide *-SU" method. This is used by the knowledge of the DNA sequence of a class II HLA gene, especially a DQB gene as a tracer for polymorphism analysis of the oligonucleotide which carries out hybridization specifically by the given part of the arrangement of the gene. The information on a possible peak is acquired by lack of those hybridization or hybridization based on a difference of those arrangement, and these oligonucleotides are chosen so that various alleles may be identified. Even if they affect a single nucleotide, any differences of arrangement should be detectable.

The typing method which uses an oligonucleotide as a base, are applicable to DNA as indicated in the literature of ANGELINI et al. and Nat. Acad. Sci. USA vol. 83:4489-4493 (1986). It is applicable to RNA (C. refer to UCLA, J. J. VAN ROOD, J. GORSKI, and B. MACH (1987) J. Clin. Invest. 80-1155).

Nucleic acid amplifying method, such as PCR, made easy analysis of DNA of the individual class II HLA. ANGELINI and others shows application of the beginning of typing which uses the oligonucleotide for the class II HLA as a base to the literature quoted above.

Target DNA is made to adhere to nylon membrane, and the what is called "Southern" method is used. [that detects with the oligonucleotide probe by which the sign was carried out]

When the method, The class II which cannot be identified in the usual serology. . Were applied to detection of HLA allele. J. — M. TIERCY, J. GORSKI, M. JEANNET, and B. MACH (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 198 and J. M. TIERCY, J. GORSKI, H. BETUEL, and A. C., [FREIDEL and] L. refer to GEBURHRER, M. JEANNET and B. MACH (1989) Human Immunol. 24, and 1. International patent application PCT WO for which another direct application on class II HLA typing used the what is called "dot blot" method It is indicated to 89/11547. What is called a "reverse dot" Although it comprises detecting hybridization with the target by which law combined the nucleotide probe with a paper or a nitrocellulose membrane, and the sign was done, This is applied to detection of HLA DQA typing and Mediterranean sea nature beta-thalassemia mutation (R. K. SAIKI et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol. 86, p. 6230- 6234; (1989)).

Typing of a cell needs detection of the point mutation of a genome, and is accompanied by development of the probe which has susceptibility of enough in detection of the homologous array on one nucleotide, and distinction between homologous arrays. Therefore, although it is generally less than 30 nucleotides and high singularity is given about a test, good susceptibility uses the old short probe. Use of a short oligonucleotide makes it possible to have large selectivity.

High singularity and good susceptibility are not only shown, but use is still easier, it can carry out promptly, and development of the typing method automatable cheaply and easily is desired. His invention relates to the method, probe, and kit for HLA DQB1 typing which satisfies these requirements.

The method of this invention is applicable to detection of the allelic variation object which can be used for typing the heterozygosity sample of the various origins of a cDNA mold etc., and cannot be distinguished in the usual serological method.

Although the probe of this invention is explained below, in a Southern type method, it can be used

the form (it is a sign with a usual tracer) of a detection probe, or can be preferably used in the form (sandwiches or reverse dot blotting) of the capture probe fixed on the solid support. The typing system of this invention uses preferably a what is called "sandwiches" protocol first indicated by DUNN A.R. and HASSEL J.A. (Cell, 12, 23, 1977). Combine it with a solid support and the complementary to first nucleotide probe called a capture probe specific to the target gene in sample, and the target's another field. It comprises using the probe which enables detection of hybridization and with which the sign of the second was carried out, and what is called a detection probe by being shown with a marker. In the system of this invention, markers are enzymes, such as horseradish peroxidase, and can use other suitable arbitrary markers. The method of this invention is based on selection of the oligonucleotide probe chosen so that the length and constituent not only give the singularity and susceptibility which are needed, but use the specified temperature might be enabled. That is, especially the typing system of this invention has the advantage of enabling operation at single 37 °C temperature of 2 °C. However, the length is able to mean use of a certain probe which is changed as for a grade by using the buffer solution which promotes especially the stability of a hybridization complex to some extent even in the case of the probe which meant detecting point mutation at a given temperature so that clearly. The probe of this invention follows, and especially, although it is near 37 °C, operation. When it is desirable to carry out at the temperature which is not 37 °C (a error is actually produced in temperature assay in many cases), it is prescribed by the arrangement considered that the length is generally the maximum, and the still more nearly optimal arrangement for the temperature of 37 °C is also shown. If it is a specialist, it is clear that the complementary probe corresponding to the oligonucleotide probe of each specification can, of course, also play the same role as capture or detection probe. This invention follows and is extended even to the method of using the probe explained below, the probes which have complementary arrangement, and these complementary sequences.

The theme of this invention is a probe which has the nucleotide sequence chosen so that the above mentioned requirements might be satisfied. Especially this invention distinguishes between various alleles according to the concomitant use, and if it is required, it is related with the new probe which even makes it possible to identify various HLA DQ singularity (naming of an HLA system factor, 1995, Bodmer Julia G et al., Tissue Antigens, 1995 and 46, 1-18) known by today. Especially the nucleotide probe of this invention is chosen from what is shown below (arrangement shows 5' end → 3' end from the left to the right.). An alphabetical letter expresses the nucleotide (or base) by the usual naming. The arrangement of an underline part expresses the optimal arrangement under the desirable operating condition concerning this invention. Therefore, the probe can contain at least 1 chosen from bases other than an underline part, or two other bases further including the arrangement of an underline part. That is, according to a case (saving the continuity of the arrangement, of course), 1 or two other bases can be included in 1, two other bases, or 3' end, and one other base can be included in 5' end at one another base and 3' end at 5' end. It is actually publicly known for the length of the probe used according to the operating condition which makes it possible to change hybridization bond strength, such as character of hybridization, washing temperature and hybridization, and/or a washing buffer, to be adjusted. It is thought that the introduction to the probe of a modified base (for example, inosine) plays the same role. Especially the probe of this invention is chosen from the following arrangement (the singularity recognized is shown to each probe), or those complementary arrangement.

5' GTG CGT TAT GTG ACC AGA 3'

26B): This recognizes DQB1 06011, 06012, and 0301 and 0304 singularity.;

5' TTG CGT CTT GTG ACC AGA 3'

26C): DQB1 0602, 0302, and 03032 singularity;

TT CTT GTA ACC AGA CAC AT

26D): DQB1 0603, 0604, 0607, and 0608 singularity;

TGT CTT GTA ACC AGA TAC AT

26F): DRQB1 06051, 06052 and 0606, and 0609 singularity;

TGT CTT GTG AGC AGA AGC AT

26E): 0201 and 0202 singularity;

TG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G

23A): DQB1 0401 singularity;

TAC CGG GCA GTG ACG C

49A): DQB1 0501 singularity;

T ACG CCG CTG GGI CCG CCT G

55A): DRB1 0301, 0302, 03032, 0304, and 0305 singularity;

T ACG CCG CTG GGG CCG CCT G

55'A): DRB1 0301, 0302, 03032, 0304, and 0305 singularity;

T GAG GGIACC CIG GCI GAG T

70A): DRB1 0602, 0603, and 0608 singularity;

T GAG GGG ACC CGG GCG GAG T

70'A): DRB1 0602, 0603, and 0608 singularity;

T CG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C

70B): DRB1 0401 and 0402 singularity.

The probes of this invention are also the probes 23a, 23B, 26c, 26f, 37C, 37a, 45a, 57D, 57E, 57F and 70C which define those nucleotide sequences below again, and the singularity which they recognize is shown in attached Table 4.

Of course, if it is a request, as shown in Tables 1 and 2 to attach, other probes used as an additional probe can perform distinction between a certain fixed singularity.

The new probe of this invention also contains again the probes HRP1 and HRP2 explained below.

In the arrangement of the above-mentioned oligonucleotide probe, I expresses inosine.

In order to raise inosine by making still more unstable the hybrid for which this probe forms the distinction ability of a probe with the nucleic acid sequence which is not the same as strictly a new thing of the examination target in the sample which has this probe. It is a nucleotide of non nature used with the probe of this invention of a certain kind.

The arbitrary names containing the characters (HRP1 etc.) in which the number was attached to the number or the back that the character was attached to back, such as 23A, 26A, and 26B, in the statement of this invention. Although the whole (thing containing another bases other than a thin including only the arrangement of an underline part and further 1, or two underline parts) probe defined in this way is shown, in the following experiment portion and an attached table, these names show only the probe which has the optimal arrangement of an underline part.

The theme of this invention is the method of determining selectively at least DQB1 typing of the nucleic acid which exists in a sample again. In this method, hybridization with the oligonucleotide probe of this nucleic acid in a sample is examined in accordance with a publicly

known method, the examination from which hybridization is effectively observed at a single temperature equal to 37**2 ** is chosen as a positive examination, and this oligonucleotide probe

TG CGT TAT GTG ACC AGA (26B),

GTG CGT CTT GTG ACC AGA (26C),

GT CTT GTA ACC AGA CAC AT (26D),

CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT (26F),

CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT (26E),

GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G (23A),

G TAC CGG GCA GTG ACG C (49A),

G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G (55A),

G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T (70A),

TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C (70B),

GG ACC GAG ITI GTG CGG GGT G (23a),

C AAC GGG ACC GAG IGI GTG CG (23B),

GTG CGT CTT ITG ACC AGA TA (26c),

CGT CTT GTA ACC AGI TAC AT (26f),

T AAC CGA GAA GAG TAC GTG C (37C),

C GAG GAI GAC GTG CGC TT (37a),

GC GAC GTG IAI GTG TAC CG (45a),

G GGG IGI CCT IAC GIC GAG TAC T (57D),

GGG CCG CCT IAC ICC GAG (57E),

GGG CCI CCT GCC GCC GA (57F),

TG GAG GGG GCC CGG GCG TCG G (70C),

s the following. :

r including at least one probe chosen from the group which comprises those complementary sequences, this probe may contain at least 1 or two bases which are chosen from bases other than an underline part further including the arrangement of an underline part, holding the continuity of arrangement so that it may be understood.

specially this invention about the above-mentioned method in this method. - At least one of the probes 26D, 26E, 49A, 70A, and 70B. - At least one of at least one of the probes 26E, 49A, 70A, and 70B, - and/or at least one of the probes 57D, 57E, 57F, 1, and/or the probes 23a, 23B,

6c, 37C, 37a, 45a, and 70C is used.

n the above-mentioned method, this invention is the nucleic acid and the following probe in a ample further again. : ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG

26A); DQB1 singularity:0501 recognized, 0502, 05031, 05032, 0602, 0604, 0607 and 0608;
3G CCT GTT GCC GAG TAC T

57A); DQB1 singularity:0501 recognized, 0604, 06051, 0606, 0608 and 0609;
3GG CCT AGC GCC GAG TAC T

57B); DQB1 singularity:0502 and 0504 which are recognized;
3GG CCT GAT GCC GAG TAC

57C); DQB1 singularity:05032 recognized, 0602, 0603 and 0607;
3C GAC GTG GAG GTG TAC CG

45A); DQB1 singularity:0301 and 0304 which are recognized;
1 GAG GAG GAC GTG CGC TT

37A); it is related also with the method of examining at least one hybridization of DQB1 singularity:06011 recognized and 06012; or those complementary sequences.

n the above-mentioned method, especially this invention relates to the method of using it ombining three probes [at least one] 57D, 57E, and 57F of the probes 57A, 57B, and 57C. f course, the examination chosen is as having described above still more noting that it is ositive.

n the method of this invention, the hybridization conditions used are conditions beforehand ecided to produce at the single temperature which the hybridization with each probe chose, only hen a target includes the thing of a probe, and completely complementary arrangement so that learly. The easy usual experiment can determine these conditions. It is the nucleic acid which xists in a sample and includes the polymorphism field of an individual HLA DQ gene as well as a arget.

f it is a specialist, the various probes which can be used by this invention method according to he selected art, It is understood easily that they may be any of the probe combined with the igand which meant making easy combination to the probe or solid support by which the sign was arried out, or the probe already combined with the solid support. In particular, in accordance ith the publicly known method, it may fix on the solid support, or fixes, and a probe can be use s a capture probe in that case.

ccording to the specific mode, a hybridization examination is done using the probe above- entioned as a capture probe, i.e., the probe combined with the solid support.

n order to show the possible existence of the nucleic acid combined with the solid support by ybridization with a given capture probe, the field of the target except being recognized by this apture probe and the detection probe which can carry out hybridization and by which the sign was arried out can be used. In particular, it is the following (an underline part is equivalent to he minimum arrangement, as mentioned above.). :
3G ACG GAG CGC GTG CG (HRP1),

3 ATC TAT AAC CGA GA (HRP2),

3GC TTC GAC AGC GAC GTG G (HRP3).

t is possible to use the detection probe ** chosen.

f attached Table 1 is seen, it can be easily determined in these detection probes in which to be sable with a given capture probe.

According to this invention method, identification of allele can be presumed from the coupled models of a series of probes with each probe respectively specific into the portion from which a LA DQ gene differs. If the typing method which uses the oligonucleotide of this invention as a base by choosing some probes is a request, it will enable identification of all the DQB1 alleles. Even if new allele is discovered, it will become possible for these to be published by record of class II HLA arrangement, and for this to enable renewal of a set of the specific probe by another probe, therefore to be adapted for detection of arbitrary new alleles in the method.

In order to rationalize perfect class II HLA typing, it being possible in the first place is performing the first DQB typing process that enables identification of the main HLA DQB singularity by use of a fixed number of probes first.

For many clinical uses, this process comes out enough and there are many a certain things. However, this invention also permits the second process of DQB typing which enables recognition of all the HLA DQB singularity publicly known by today with many probes.

Analysis of the HLA DQB singularity by the typing method which uses the oligonucleotide of this invention as a base. As what is replaced with serology, it can be used at the histocompatibility laboratory for the usual DQB typing. Typing of a kidney donor with DQB typing of the patient in the list of names which are waiting for the kidney transplantation especially, or possibility, typing of the donor who may not have DQB typing and its family, or relative of the leukemia patient who is planning a bone marrow transplantation. Large-scale DQB typing for the bone marrow donor list-of-names creation as a volunteer can be performed, or the relevance of the illness in or the application to preventive medicine or real father investigation, and other legal checks for example, insulin dependent diabetes mellitus) and an HLA system can be determined.

The organization of every mold containing HLA DQB nucleic acid can use it as a sample in this invention method. The fragment (DNA or RNA) of the nucleic acid obtained after chemical or enzymatic cutting etc. of the nucleic acid which exists in a sample can also be used. However, the amplification preliminary process of DNA or RNA should be performed actually.

Each kit for HLA DQB1 typing is also the theme of this invention. This kit The following probe: 26B, 26C, 26D, 26F, 26E, 23A, 49A, 55A, 70A, 70B, 23a, 23B, 26c, One or more probes chosen from 26A, 57B, 57C, 37A, 45A, 57A, and HRP3 can be further included including at least one of 26F, 7C, 37a, 45a, 57D, 57E, 57F, 70C, HRP1, and the HRP2.

In course in this invention method and a corresponding kit, the shown probe can be replaced by those complementary sequences.

Especially this invention relates to the kit which contains at least one of the probes 45A and 37 and the following probe (especially capture probe): 26B, 26C, 26D, 26E, 26F, 23A, 49A, 55A, 70A, 70B, 26A, 57B, 57C and 57A, and request. This kit can contain further one or more detection probe chosen from HRP1, HRP2, and HRP3.

Again this invention At least one of the following: -probes 26D, 26E, 49A, 70A, and 70B. - Or at least one of the probes 26E, 49A, 70A, and 70B. - And/or, it is related with the kit containing at least one of at least one of the probes 57D, 57E, and 57F, -, and/or the probes 23a, 23B, 26c, 6F, 37C, 37a, 45a, and 70C.

Especially this invention relates to the kit containing following probe: 23a, and 23B, 26c, 26D, 6E, 26f, 37a, 37C, 45a, 49A, 57A, 57B, 57C, 57D, 57E, 57F, 70A, 70B and 70C.

The information collected by use of these probes is used for the determination of typing by the established typing plan in consideration of the knowledge of the HLA DQB type which ranked second and was written in the probe and list which were used, and/or the subtype of relation. This work is implied by use of the table directly shown as a function of the positive reaction (hybridization) which can accept a typing plan, i.e., a type, and/or a subtype. The example of a typing plan is shown in attached Tables 3 and 5.

The probe used by this invention is an oligonucleotide (OSS) specific in the arrangement which can be specifically combined with those complementary sequences under relevant conditions. The probe is called OSA when a certain specific probe can use it for identification of the only probe. That

s, it is an oligonucleotide specific to one allele. As already described above, in one probe, specific DQB allele cannot be identified by itself.

Some definitions of term used by this invention are shown below.

Genotype" means the feature of each opposite genome as the "phenotype" which is a gene expression product, especially each feature shown by analysis of protein.

Allele" shows another various molds of the same gene, and shows a difference on the level of a nucleic acid sequence. These differences are shown by the level of DNA, the level of RNA, and the level of translation in those protein.

Polymorphism" is characterized by the diversity which one group is brought by existence of the allele from which the same gene differs.

he "oligonucleotide" used on these specifications shows a primer, a probe, or the nucleic acid reagent that must be detected. An oligonucleotide can be prepared by the suitable arbitrary publicly known methods.

ables 1-4 to attach are referred to in explanation of this invention and the following experiments. The same probe names (26A, HRP3, etc.), It should be cautious of the ability of not only the arrangement (when it is the above-mentioned explanation) chisel that can specify some probes at the arrangement (in the case of the following example and Tables 1-4 to attach) corresponding to the minimum arrangement of an underline part to be shown by showing the minimum arrangement of an underline part.

he arrangement of DNA of various alleles of the DQB gene by specifying the position of the mutation corresponding to the amino acid mutation (it specifies in single-character code) expressed to Table 2 in attached Table 1 about the selected consensus sequence which is DQB1*0501 is expressed. The mutation of DNA may be non-silent mutation, i.e., the mutation which brings about change of amino acid by the translation.

n typing of various alleles, in a large majority with that clearly right. Although the mutation in DNA equivalent to non-silent mutation is used in very many cases, it is possible by distinguishing between two dramatically similar alleles, for example to detect silence type mutation.

t is known for literature publicly known by today, and the nucleotide and amino acid sequence of QB1 gene about all the announced alleles are shown in Tables 1 and 2.

able 3 to attach summarizes correspondence between the singularity recognized to be probes, and then the rectangular head of a certain sequence is applied black, it means that the singularity which mentioned this in this sequence is recognized by the probe of the column of correspondence. Attached Table 4 reproduces correspondence between a probe and HLA DQB1 singularity, and shows silent mutation or variation amino acid further.

he following example explains this invention.

xample 1: The various probes combined with the ligand which promotes the combination to a solid support were produced. The used ligand is Aminolink2 (the product made by Applied Biosystems, the reference number 400808).

t is a compound of marketing to say.

coupling to the oligonucleotide of ligand follows the following general protocol, and is

*****.

n oligonucleotide is compounded according to a manufacturer's protocol using phosphor friend AIT0 chemicals on the automatic 381A device made from Applied Biosystems. If composition of an oligonucleotide is completed, the phosphor friend DAIT0 ligand dissolved in anhydrous acetonitrile at the concentration of 0.2M will be put on the position X of a synthetic machine, and ligand will be added by 5' end of an oligonucleotide according to a standard automatic composition protocol. Among a 33% ammonium hydroxide solution and after performing deprotection at 55 °C overnight and performing ethanol precipitate at -20 °C subsequently, modified oligonucleotide (what was combined with ligand) is dried under a vacuum, and 1 ml of water is made to absorb.

t is Brownlee RP18 column (10 mm - 25 cm) about the oligonucleotide with which 5' end was immobilized.

he upper opposite phase high performance liquid chromatography refines.

onditions: A part for 4.6 ml of rates-of-flow/ 10% of inclination -> 35% of buffer solution A, - 30 minutes; 35% of] 100% of buffer solution B. Triethylammonium acetate (TEAA) of A:0.1 mol of -minute buffer solution, The CH₃CN example 2 of A:50% of the buffer solution of B:50% of pH 7
uffer solution: Production of a detection probe It is used like Example 1, It is activated and he horseradish peroxidase (Boehringer Mannheim413470) of the 1.25×10^{-7} mol (5 mg) in the 0.1M odium-borate buffer solution (pH 9.3) of 200microl is made to absorb the dry oligonucleotide. efining protocols are the same. Conjugate is saved at tris-HCl buffer solution (pH 7) which ontains 40% of glycerol at -20 **.
xample 3: Amplification of target DNA PCR performs amplification using the following primer.

Primer 1 : **5' C ATG TGC TAC TTC ACC AAC GG 3'**

Primer 2 : **5' CTG GTA GTT GTG TCT GCA CAC 3'**

able 1 shows these primers under the name of DQBAMP-A and DQBAMP-B.

xample 4: To the well of a microtiter plate (Nunc 43454). Capture oligonucleotide solution 100mu f the given DQ singularity of the concentration of 10 - 400nM in 3xPBS (NaCl of 0.45M, sodium hosphate of 0.15M, pH 7) is put in (one a capture oligonucleotide / well comparatively).

efore, many wells of the same like as a capture probe required for typing are used. A plate i ncubated at 2 hours or a room temperature at 37 ** for 15 to 22 hours.

n all the cases, in order to check an amplification process and a detection process, positive ontrast is added. The capture probe used as positive contrast (it is considered as C+) exists on ll the alleles publicly known by today. The arrangement is as follows.

'GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAG GA3' A capture probe is used as negative contrast (it is considered s C-). :5'TAT GAA ACT TAT GGG GAT AC3' whose arrangement is as follows. A plate is washed 3 time y PBS Tween (NaCl of 0.15M, sodium phosphate of 0.05M, pH 7; 0.5% Tween 20 (MERCK822184)) of 00microl. Amplification products are denaturalized by NaOH of 2N of 10microl for 5 minutes at a oom temperature. this solution - 2N acetic acid of 10microl - subsequently - 2.3 ml of

ybridization buffer solution (sodium phosphate of PEG:0.1M.) NaCl of pH 7 and 0.5M, 0.65% of ween 20, sperm DNA of a 0.14mg/ml salmon (SigmaD9156), PEG 4000 (Merck 807490 2%) and the 0.25-m etection probe by which the sign was carried out (oligonucleotide peroxidase conjugate)

quential addition is carried out. A final solution is distributed to each well at a rate of 0.1 l / well. A plate is incubated for 60 minutes at 37 **. A plate is washed 3 times by PBS Tween o 00microl. the OPD buffer solution (the citrate of 0.05M.) of an alt. phenylenediamine (OPD) ubstrate (Cambridge Medical Biotechnology reference number 456) Na₂HPO₄ of 0.1M and 100micro of

hings l of the 4mg [/ml] concentration in pH 4.9 are added to each well, and hydrogen peroxide f the 30 time volume diluted to 1/1000 just before use is added. Enzyme activity is blocked by 1 ₂SO₄ of 100microl after the reaction for 20 minutes, and it reads at 492 nm.

xample 5: Ten DNAs are amplified in accordance with the PCR method. Subsequently, it types. enerally the protocol of typing follows the above-mentioned thing. Hybridization is performed in ccordance with a sandwich technique.

n the protocol of typing, detection probe HRP1, HRP2, or HRP3 are used according to the above- entioned capture probe and case.

he indicated method enables typing of ten examined DNAs. Some typing results are considered as xplanation and shown below.

ase No.1 : Probe ODx1000 (492 nm). 26A 15 49A12 57B38 57c12 37A12 26B100 26C1309 26D10 26F 18 0A32 26E **** 55A 316 70B12 23A 13**** means saturation.

esult: A patient is DQB1*0201, 0202/0302, or 0303.

ase No.2 : Probe ODx1000 (492 nm). 26A 887 49A12 57B459. 57c 11 37A5726B80 26C10 26D14 26F 10 0A14 26E11 55A11 70B688 23A 302 result: Patients are DQB1*0502/0401.

xample 6: Although the same procedure as the method of a statement is followed in the Example 5, he capture probe enumerated to attached Table 5 is used.

result is summarized in attached Table 6.

1

衣

1	AGA	CAC	TCT	CCC	GAG	GAT	TTC	GTG	TAC	CAG	TTT	AAA	GCC	CTG	TGG	TAC	TTC	ACC	AAC	GGA	38	HRP2
DOBAMP-A																						
10																						
11																						
12																						
13																						
14																						
15																						
16																						
17																						
18																						
19																						
20																						
21																						
22																						
23																						
24																						
25																						
26																						
27																						
28																						
29																						
30																						
31																						
32																						
33																						
34																						
35																						
36																						
37																						
38																						
39																						
40																						
41																						
42																						
43																						
44																						
45																						
46																						
47																						
48																						
49																						
50																						
51																						
52																						
53																						
54																						
55																						
56																						
57																						
58																						
59																						
60																						
61																						
62																						
63																						
64																						
65																						
66																						
67																						
68																						
69																						
70																						
71																						
72																						
73																						
74																						
75																						
76																						
77																						
78																						
79																						
80																						
81																						
82																						
83																						
84																						
85																						
86																						
87																						
88																						
89																						
90																						
91																						
92																						
93																						
94																						
95																						
96																						
97																						
98																						
99																						
100																						

表 統 葉

DBI*0301	CAG	GAG	TAC	CTG	COC	TTC	GAC	AAC	GAC	GTG	CAG	CTG	CTG	CTG
DBI*0302
DBI*0303
DBI*0304
DBI*0305
DBI*0306
DBI*0307
DBI*0308
DBI*0309
DBI*0310
DBI*0311
DBI*0312
DBI*0313
DBI*0314
DBI*0315
DBI*0316
DBI*0317
DBI*0318
DBI*0319
DBI*0320
DBI*0321
DBI*0322
DBI*0323
DBI*0324
DBI*0325
DBI*0326
DBI*0327
DBI*0328
DBI*0329
DBI*0330
DBI*0331
DBI*0332
DBI*0333
DBI*0334
DBI*0335
DBI*0336
DBI*0337
DBI*0338
DBI*0339
DBI*0340
DBI*0341
DBI*0342

衣 一 葉 一

DGBAMP-B		80		160																	
				90				100				110				120					
		Q10	Q20	Q30	Q40	Q50	Q60	Q70	Q80	Q90	Q100	Q110	Q120	Q130	Q140	Q150	Q160	Q170	Q180	Q190	Q200
Q08110501	Q08110502	Q08110503	Q08110504	Q08110505	Q08110506	Q08110507	Q08110508	Q08110509	Q08110510	Q08110511	Q08110512	Q08110513	Q08110514	Q08110515	Q08110516	Q08110517	Q08110518	Q08110519	Q08110520	Q08110521	Q08110522
Q08110523	Q08110524	Q08110525	Q08110526	Q08110527	Q08110528	Q08110529	Q08110530	Q08110531	Q08110532	Q08110533	Q08110534	Q08110535	Q08110536	Q08110537	Q08110538	Q08110539	Q08110540	Q08110541	Q08110542	Q08110543	Q08110544
Q08110545	Q08110546	Q08110547	Q08110548	Q08110549	Q08110550	Q08110551	Q08110552	Q08110553	Q08110554	Q08110555	Q08110556	Q08110557	Q08110558	Q08110559	Q08110560	Q08110561	Q08110562	Q08110563	Q08110564	Q08110565	Q08110566
Q08110567	Q08110568	Q08110569	Q08110570	Q08110571	Q08110572	Q08110573	Q08110574	Q08110575	Q08110576	Q08110577	Q08110578	Q08110579	Q08110580	Q08110581	Q08110582	Q08110583	Q08110584	Q08110585	Q08110586	Q08110587	Q08110588
Q08110589	Q08110590	Q08110591	Q08110592	Q08110593	Q08110594	Q08110595	Q08110596	Q08110597	Q08110598	Q08110599	Q08110600	Q08110601	Q08110602	Q08110603	Q08110604	Q08110605	Q08110606	Q08110607	Q08110608	Q08110609	Q08110610
Q08110611	Q08110612	Q08110613	Q08110614	Q08110615	Q08110616	Q08110617	Q08110618	Q08110619	Q08110620	Q08110621	Q08110622	Q08110623	Q08110624	Q08110625	Q08110626	Q08110627	Q08110628	Q08110629	Q08110630	Q08110631	Q08110632
Q08110633	Q08110634	Q08110635	Q08110636	Q08110637	Q08110638	Q08110639	Q08110640	Q08110641	Q08110642	Q08110643	Q08110644	Q08110645	Q08110646	Q08110647	Q08110648	Q08110649	Q08110650	Q08110651	Q08110652	Q08110653	Q08110654
Q08110655	Q08110656	Q08110657	Q08110658	Q08110659	Q08110660	Q08110661	Q08110662	Q08110663	Q08110664	Q08110665	Q08110666	Q08110667	Q08110668	Q08110669	Q08110670	Q08110671	Q08110672	Q08110673	Q08110674	Q08110675	Q08110676
Q08110677	Q08110678	Q08110679	Q08110680	Q08110681	Q08110682	Q08110683	Q08110684	Q08110685	Q08110686	Q08110687	Q08110688	Q08110689	Q08110690	Q08110691	Q08110692	Q08110693	Q08110694	Q08110695	Q08110696	Q08110697	Q08110698
Q08110699	Q08110700	Q08110701	Q08110702	Q08110703	Q08110704	Q08110705	Q08110706	Q08110707	Q08110708	Q08110709	Q08110710	Q08110711	Q08110712	Q08110713	Q08110714	Q08110715	Q08110716	Q08110717	Q08110718	Q08110719	Q08110720
Q08110721	Q08110722	Q08110723	Q08110724	Q08110725	Q08110726	Q08110727	Q08110728	Q08110729	Q08110730	Q08110731	Q08110732	Q08110733	Q08110734	Q08110735	Q08110736	Q08110737	Q08110738	Q08110739	Q08110740	Q08110741	Q08110742
Q08110743	Q08110744	Q08110745	Q08110746	Q08110747	Q08110748	Q08110749	Q08110750	Q08110751	Q08110752	Q08110753	Q08110754	Q08110755	Q08110756	Q08110757	Q08110758	Q08110759	Q08110760	Q08110761	Q08110762	Q08110763	Q08110764
Q08110765	Q08110766	Q08110767	Q08110768	Q08110769	Q08110770	Q08110771	Q08110772	Q08110773	Q08110774	Q08110775	Q08110776	Q08110777	Q08110778	Q08110779	Q08110780	Q08110781	Q08110782	Q08110783	Q08110784	Q08110785	Q08110786
Q08110787	Q08110788	Q08110789	Q08110790	Q08110791	Q08110792	Q08110793	Q08110794	Q08110795	Q08110796	Q08110797	Q08110798	Q08110799	Q08110800	Q08110801	Q08110802	Q08110803	Q08110804	Q08110805	Q08110806	Q08110807	Q08110808
Q08110809	Q08110810	Q08110811	Q08110812	Q08110813	Q08110814	Q08110815	Q08110816	Q08110817	Q08110818	Q08110819	Q08110820	Q08110821	Q08110822	Q08110823	Q08110824	Q08110825	Q08110826	Q08110827	Q08110828	Q08110829	Q08110830
Q08110831	Q08110832	Q08110833	Q08110834	Q08110835	Q08110836	Q08110837	Q08110838	Q08110839	Q08110840	Q08110841	Q08110842	Q08110843	Q08110844	Q08110845	Q08110846	Q08110847	Q08110848	Q08110849	Q08110850	Q08110851	Q08110852
Q08110853	Q08110854	Q08110855	Q08110856	Q08110857	Q08110858	Q08110859	Q08110860	Q08110861	Q08110862	Q08110863	Q08110864	Q08110865	Q08110866	Q08110867	Q08110868	Q08110869	Q08110870	Q08110871	Q08110872	Q08110873	Q08110874
Q08110875	Q08110876	Q08110877	Q08110878	Q08110879	Q08110880	Q08110881	Q08110882	Q08110883	Q08110884	Q08110885	Q08110886	Q08110887	Q08110888	Q08110889	Q08110890	Q08110891	Q08110892	Q08110893	Q08110894	Q08110895	Q08110896
Q08110897	Q08110898	Q08110899	Q08110900	Q08110901	Q08110902	Q08110903	Q08110904	Q08110905	Q08110906	Q08110907	Q08110908	Q08110909	Q08110910	Q08110911	Q08110912	Q08110913	Q08110914	Q08110915	Q08110916	Q08110917	Q08110918
Q08110919	Q08110920	Q08110921	Q08110922	Q08110923	Q08110924	Q08110925	Q08110926	Q08110927	Q08110928	Q08110929	Q08110930	Q08110931	Q08110932	Q08110933	Q08110934	Q08110935	Q08110936	Q08110937	Q08110938	Q08110939	Q08110940
Q08110941	Q08110942	Q08110943	Q08110944	Q08110945	Q08110946	Q08110947	Q08110948	Q08110949	Q08110950	Q08110951	Q08110952	Q08110953	Q08110954	Q08110955	Q08110956	Q08110957	Q08110958	Q08110959	Q08110960	Q08110961	Q08110962
Q08110963	Q08110964	Q08110965	Q08110966	Q08110967	Q08110968	Q08110969	Q08110970	Q08110971	Q08110972	Q08110973	Q08110974	Q08110975	Q08110976	Q08110977	Q08110978	Q08110979	Q08110980	Q08110981	Q08110982	Q08110983	Q08110984
Q08110985	Q08110986	Q08110987	Q08110988	Q08110989	Q08110990	Q08110991	Q08110992	Q08110993	Q08110994	Q08110995	Q08110996	Q08110997	Q08110998	Q08110999	Q08111000	Q08111001	Q08111002	Q08111003	Q08111004	Q08111005	Q08111006
Q08111007	Q08111008	Q08111009	Q08111010	Q08111011	Q08111012	Q08111013	Q08111014	Q08111015	Q08111016	Q08111017	Q08111018	Q08111019	Q08111020	Q08111021	Q08111022	Q08111023	Q08111024	Q08111025	Q08111026	Q08111027	Q08111028
Q08111029	Q08111030	Q08111031	Q08111032	Q08111033	Q08111034	Q08111035	Q08111036	Q08111037	Q08111038	Q08111039	Q08111040	Q08111041	Q08111042	Q08111043	Q08111044	Q08111045	Q08111046	Q08111047	Q08111048	Q08111049	Q08111050
Q08111051	Q08111052	Q08111053	Q08111054	Q08111055	Q08111056	Q08111057	Q08111058	Q08111059	Q08111060	Q08111061	Q08111062	Q08111063	Q08111064	Q08111065	Q08111066	Q08111067	Q08111068	Q08111069	Q08111070	Q08111071	Q08111072
Q08111073	Q08111074	Q08111075	Q08111076	Q08111077	Q08111078	Q08111079	Q08111080	Q08111081	Q08111082	Q08111083	Q08111084	Q08111085	Q08111086	Q08111087	Q08111088	Q08111089	Q08111090	Q08111091	Q08111092	Q08111093	Q08111094
Q08111095	Q08111096	Q08111097	Q08111098	Q08111099	Q08111100	Q08111101	Q08111102	Q08111103	Q08111104	Q08111105	Q08111106	Q08111107	Q08111108	Q08111109	Q08111110	Q08111111	Q08111112	Q08111113	Q08111114	Q08111115	Q08111116
Q08111117	Q08111118	Q08111119	Q08111120	Q08111121	Q08111122	Q08111123	Q08111124	Q08111125	Q08111126	Q08111127	Q08111128	Q08111129	Q08111130	Q08111131	Q08111132	Q08111133	Q08111134	Q08111135	Q08111136	Q08111137	Q08111138
Q08111139	Q08111140	Q08111141	Q08111142	Q08111143	Q08111144	Q08111145	Q08111146	Q08111147	Q08111148	Q08111149	Q08111150	Q08111151	Q08111152	Q08111153	Q08111154	Q08111155	Q08111156	Q08111157	Q08111158	Q08111159	Q08111160
Q08111161	Q08111162	Q08111163	Q08111164	Q08111165	Q08111166	Q08111167	Q08111168	Q08111169	Q08111170	Q08111171	Q08111172	Q08111173	Q08111174	Q08111175	Q08111176	Q08111177	Q08111178	Q08111179	Q08111180	Q08111181	Q08111182
Q08111183	Q08111184	Q08111185	Q08111186	Q08111187	Q08111188	Q08111189	Q08111190	Q08111191	Q08111192	Q08111193	Q08111194	Q08111195	Q08111196	Q08111197	Q08111198	Q08111199	Q08111200	Q08111201	Q08111202	Q08111203	Q08111204
Q08111205	Q08111206	Q08111207	Q08111208	Q08111209	Q08111210	Q08111211	Q08111212	Q08111213	Q08111214	Q08111215	Q08111216	Q08111217	Q08111218	Q08111219	Q08111220	Q08111221	Q08111222	Q08111223	Q08111224	Q08111225	Q08111226
Q08111227	Q08111228	Q08111229	Q08111230	Q08111231	Q08111232	Q08111233	Q08111234	Q08111235	Q08111236	Q08111237	Q08111238	Q08111239	Q08111240	Q08111241	Q08111242	Q08111243	Q08111244	Q08111245	Q08111246	Q08111247	Q08111248
Q08111249	Q08111250	Q08111251	Q08111252	Q08111253	Q08111254	Q08111255	Q08111256	Q08111257	Q08111258	Q08111259	Q08111260	Q08111261	Q08111262	Q08111263	Q08111264	Q08111265	Q08111266	Q08111267	Q08111268	Q08111269	Q08111270
Q08111271	Q08111272	Q08111273	Q08111274	Q08111275	Q08111276	Q08111277	Q08111278	Q08111279	Q08111280	Q08111281	Q08111282	Q08111283	Q08111284	Q08111285	Q08111286	Q08111287	Q08111288	Q08111289	Q08111290	Q08111291	Q08111292
Q08111293	Q08111294	Q08111295	Q08111296	Q08111297	Q08111298	Q08111299	Q08111300	Q08111301	Q08111302	Q08111303	Q08111304	Q08111305	Q08111306	Q08111307	Q08111308	Q08111309	Q08111310	Q08111311	Q08111312	Q08111313	Q08111314
Q08111315	Q08111316	Q08111317	Q08111318	Q08111319	Q08111320	Q08111321	Q08111322	Q08111323	Q08111324	Q08111325	Q08111326	Q08111327	Q08111328	Q08111329	Q08111330	Q08111331	Q08111332	Q08111333	Q08111334	Q08111335	Q08111336
Q08111337	Q08111338	Q08111339	Q08111340	Q08111341	Q08111342	Q08111343	Q08111344	Q08111345	Q08111346	Q08111347	Q08111348	Q08111349	Q08111350	Q08111351	Q08111352	Q08111353	Q0				

2

表

	1	10	20	30	40	
DC81'0501	R	D	S	P	E	D
DC81'0502	R	D	S	P	E	D
DC81'0503	R	D	S	P	E	D
DC81'0504	R	D	S	P	E	D
DC81'0505	R	D	S	P	E	D
DC81'0506	R	D	S	P	E	D
DC81'0507	R	D	S	P	E	D
DC81'0508	R	D	S	P	E	D
DC81'0509	R	D	S	P	E	D
DC81'0510	R	D	S	P	E	D
DC81'0511	R	D	S	P	E	D
DC81'0512	R	D	S	P	E	D
DC81'0513	R	D	S	P	E	D
DC81'0514	R	D	S	P	E	D
DC81'0515	R	D	S	P	E	D
DC81'0516	R	D	S	P	E	D
DC81'0517	R	D	S	P	E	D
DC81'0518	R	D	S	P	E	D
DC81'0519	R	D	S	P	E	D
DC81'0520	R	D	S	P	E	D
DC81'0521	R	D	S	P	E	D
DC81'0522	R	D	S	P	E	D
DC81'0523	R	D	S	P	E	D
DC81'0524	R	D	S	P	E	D
DC81'0525	R	D	S	P	E	D
DC81'0526	R	D	S	P	E	D
DC81'0527	R	D	S	P	E	D
DC81'0528	R	D	S	P	E	D
DC81'0529	R	D	S	P	E	D
DC81'0530	R	D	S	P	E	D
DC81'0531	R	D	S	P	E	D
DC81'0532	R	D	S	P	E	D
DC81'0533	R	D	S	P	E	D
DC81'0534	R	D	S	P	E	D
DC81'0535	R	D	S	P	E	D
DC81'0536	R	D	S	P	E	D
DC81'0537	R	D	S	P	E	D
DC81'0538	R	D	S	P	E	D
DC81'0539	R	D	S	P	E	D
DC81'0540	R	D	S	P	E	D
DC81'0541	R	D	S	P	E	D
DC81'0542	R	D	S	P	E	D

衣 一 統 葉 一 乙

	50	60	70	80	90
CG81*0261	[57A] A	P	E		
CG81*0262	[57B] S	A			
CG81*0263	[57C] S				
CG81*0263	[57C] S				
CG81*0264	[57B] S				
CG81*0265	[57C] S				
CG81*0266	[57A] S				
CG81*0267	[57C] S				
CG81*0268	[57A] S				
CG81*0269	[57C] S				
CG81*0271	[57A] S				
CG81*0272	[57C] S				
CG81*0281	[57A] S				
CG81*0282	[57C] S				
CG81*0283	[57A] S				
CG81*0284	[57C] S				
CG81*0285	[57A] S				
CG81*0286	[57C] S				
CG81*0287	[57A] S				
CG81*0288	[57C] S				
CG81*0289	[57A] S				
CG81*0291	[57C] S				
CG81*0292	[57A] S				
CG81*0293	[57C] S				
CG81*0294	[57A] S				
CG81*0295	[57C] S				
CG81*0296	[57A] S				
CG81*0297	[57C] S				
CG81*0298	[57A] S				
CG81*0299	[57C] S				
CG81*0301	[57A] S				
CG81*0302	[57C] S				
CG81*0303	[57A] S				
CG81*0304	[57C] S				
CG81*0305	[57A] S				
CG81*0306	[57C] S				
CG81*0307	[57A] S				
CG81*0308	[57C] S				
CG81*0309	[57A] S				
CG81*0311	[57C] S				
CG81*0312	[57A] S				
CG81*0313	[57C] S				
CG81*0314	[57A] S				
CG81*0315	[57C] S				
CG81*0316	[57A] S				
CG81*0317	[57C] S				
CG81*0318	[57A] S				
CG81*0319	[57C] S				
CG81*0321	[57A] S				
CG81*0322	[57C] S				
CG81*0323	[57A] S				
CG81*0324	[57C] S				
CG81*0325	[57A] S				
CG81*0326	[57C] S				
CG81*0327	[57A] S				
CG81*0328	[57C] S				
CG81*0329	[57A] S				
CG81*0331	[57C] S				
CG81*0332	[57A] S				
CG81*0333	[57C] S				
CG81*0334	[57A] S				
CG81*0335	[57C] S				
CG81*0336	[57A] S				
CG81*0337	[57C] S				
CG81*0338	[57A] S				
CG81*0339	[57C] S				
CG81*0341	[57A] S				
CG81*0342	[57C] S				

表 3

	2 3 A	2 6 A	2 6 B	2 6 C	2 6 D	2 6 E	3 7 F	4 5 A	4 9 A	5 5 A	5 7 A	5 7 B	5 7 C	7 0 A	7 0 B
QB1*0501															
QB1*0602															
QB1*05031															
QB1*05032															
QB1*0504															
QB1*06011															
QB1*06012															
QB1*0602															
QB1*0603															
QB1*0604															
QB1*06051															
QB1*06052															
QB1*0606															
QB1*0607															
QB1*0608															
QB1*0609															
QB1*0201															
QB1*0202															
QB1*0301															
QB1*0302															
QB1*03032															
QB1*0304															
QB1*0305															
QB1*0401															
QB1*0402															

カリブグループ	変異アミノ酸	ヌクレオチド配列 5' → 3'	特異性
23A	s121L23	ACC GAG CTC GTG CGG GG	DQB1*0401
23a	s121L23	ACC GAG ITI GTG CGG GG	DQB1*0401
23B	s121R23	AC GGG ACC GAG IGI GTG	DQB1*0305+0402
26A	H30	C AGA CAC ATC TAT AAC	DQB1*0501+0502+0503+05032+0603+0604+0607+0608
26B	s125Y26	CGT TAT GTG ACC AGA	DQB1*0601+06012+0301+0304
26C	s125L26	G CGT CTT GTG ACC AGA	DQB1*0602+0302+03032
26e	s125L26	G CGT CTT ITG ACC AGA	DQB1*0602+0302+03032
26D	L26s127	CTT GTA ACC AGA CAC	DQB1*0603+0604+0607+0608
26E	L26S28S30	T CTT GTG AGC AGA AGC	DQB1*0201+0202
26F	s125L26s127Y30	T CTT GTA ACC AGA TAC	DQB1*0605+06052+0606+0609
26f	s125L26s127Y30	T CTT GTA ACC AGI TAC	DQB1*0605+06052+0606+0609
37A	D37	AG GAG GAC GTG CGC	DQB1*0601+06012
37a	D37	AG GAI GAC GTG CGC	DQB1*0601+06012
37C	s135	AC CGA GAA GAG TAC GT	DQB1*0504
43A	E45	GAC GTG GAG GTG TAC	DQB1*0301+0304
45a	E45	GAC GTG IAI GTG TAC	DQB1*0301+0304
49A	A49	AC CGG GCA GTG AC	DQB1*0501
53A	L53P55	CG CGG CTG GGI CCG CTG G	DQB1*0301+0302+03032+0304+0305
57A	V37	CCT GTT GCC GAG TA	DQB1*0501+0604+0605+0606+0608+0609
57B	S57	G CCT AGC GCC GAG TA	DQB1*0502+0504
57C	D57	G CCT GAT GCC GAG T	DQB1*05032+0602+0603+0607
57D	D57	GG IGI CCT IAC GIC GAG TA	DQB1*0503+0601+06012
57E	P55D57	G CGG CCT IAC ICC G	DQB1*0301+0332
57F	P55A57	G CCI CCT GCC GCC	DQB1*0302+0304+0305

- 編集 -

オリゴブローフ	変異アミノ酸	ヌクレオチド配列	5'→3'	特異性
70A	T71E74	AG GGG ACC CGG GCG GA		DQB1*0602+0603+0608
70B	T77del78	G GTG GAC ACC GTA TGC AG		DQB1*0401+0402
70C	G70A71	GAG GGG GCC CGG GCG TC		DQB1*0501+0502+05031+05032
C+	-	GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAG GA		-
C-	-	TAT GAA ACT TAT GGG GAT AC		-
HRP1	-	ACG GAG CGC GTG		-
HRP2	-	ATC TAT AAC CGA GA		-
HRP3	-	CGC TTC GAC AGC GAC GTG G		-

C+: 陽性の対照 C-: 陰性の対照 sl: サイレント突然変異

変異アミノ酸は一文字コードで示し、後ろにそれらの位置を示す。

表 5

	C	C	7	4	3	6	5	5	3	7	2	5	2	5	4	5	2	7	2
	+	-	0	9	7	7	7	7	7	0	8	6	7	8	5	7	3	0	3
			C	A	G	B	D	C	a	A	d	f	A	E	c	e	F	B	B
D	0501																		
Q	0502																		
B	05031																		
1	05032																		
	0504																		
	06011																		
	06012																		
	0602																		
	0603																		
	0604																		
	06051																		
	06052																		
	0609																		
	0607																		
	0608																		
	0609																		
	0201																		
	0202																		
	0301																		
	0302																		
	03032																		
	0304																		
	0305																		
	0401																		
	0402																		

表 6

ケースNo.	陽性オリゴプローブ	HLA-DQB タイピング
1	C+, 70C, 57D, 26D, 57A	HLA-DQB1*05031 / 0604
2	C+, 70C, 57B, 57C, 70A, 26c	HLA-DQB1*0502 / 0602
3	C+, 57C, 70A, 26D, 57E, 45a	HLA-DQB1*0603 / 0301
4	C+, 70C, 49A, 57A, 23B, 70B	HLA-DQB1*0501 / 0402
5	C+, 57E, 45a, 26c, 57F	HLA-DQB1*0301 / 0302
6	C+, 26c, 26E, 57E	HLA-DQB1*0201 / 03032
7	C+, 26D, 57A, 26f	HLA-DQB1*0604 / 0609
8	C+, 70C, 57B, 45a, 57F	HLA-DQB1*0502 / 0304
9	C+, 57D, 37a, 70B, 23a	HLA-DQB1*0601 / 0401
10	C+, 37C, 57B, 57C, 70A, 26c	HLA-DQB1*0504 / 0602